

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

Université de Sherbrooke

**Modulation orthostérique et allostérique du PAFR par des
molécules synthétiques**

Par
Cynthia Jenny Noël
Service d'immunologie

Mémoire présenté à la faculté de Médecine et des sciences de la santé
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en Immunologie

Gilles Dupuis Ph.D, Département de Biochimie
Fernand Gobeil Jr Ph.D, Département de Pharmacologie
Marek Rola-Pleszcynski MD, Service d'Immunologie- allergologie
Jana Stankova Ph.D, Service d'Immunologie- allergologie

23 juin 2008



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-53416-8
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-53416-8

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Table des matières

Table des matières	III
Liste des illustrations et tableaux	V
Liste des abbréviations	VII
Résumé	8
Introduction	10
Partie 1. Facteur activant les plaquettes (PAF)	10
1.1. Structure du PAF	10
1.2. Biosynthèse du PAF	11
1.3. Dégradation du PAF	13
1.4. Cellules produisant le PAF	14
1.5. Effets physiologiques et pathologiques du PAF	17
Partie 2. Récepteur du facteur d'activation des plaquettes (PAFR)	19
2.1 Caractérisation du PAFR	19
2.2 Signalisation par le PAFR	21
2.3 Désensibilisation du PAFR	24
2.4 Antagonistes du PAFR	25
Partie 3. État d'activation des GPCRs	28
3.1 Équilibre des GPCRs	28
3.2 Concept d'allostérie	29
Partie 4. But de l'étude	30
4.1 Objectifs et Hypothèses de recherche	31

Partie 5. Matériel et Méthodes	36
5.1 Produits utilisés	36
5.2 Matériel utilisé	38
Partie 6. Techniques expérimentales	40
6.1 Cellules et Stimulation	40
6.2 Méthodes impliquant les protéines	41
6.3 Essais fonctionnels	44
6.4 Analyses statistiques	45
Partie 7. Résultats	46
7.1 Molécules orthostériques	46
7.2 Modulateurs potentiellement allostériques	69
7.3 Surnageants d'hybridomes	77
Partie 8. Discussion	87
Partie 9. Conclusion	95
Remerciements	97
Bibliographie	98
Annexe	110

Liste des illustrations et tableaux

Figure 1. Structure du PAF (BENVENISTE et al. 1974)

Figure 2. Biosynthèse du PAF (FEUERSTEIN et al. 1996)

Figure 3 : Séquence en acides aminés du PAFR humain (NAKAMURA et al. 1991)

Figure 4 : État d'équilibre des GPCR (SEIFERT et WENZEL-SEIFERT. 2002)

Tableau 1. Réponses induites par le PAF dans les différentes cellules et organes (ISHII et SHIMIZU, 2000)

Tableau 2. Effets physiologiques et pathologiques du PAF (IZUMI et SHIMIZU, 1995)

Tableau 3. Effets de différents antagonistes du PAFR (PEPLOW 1999)

Tableau 4. Molécules orthostériques

Résultats

Figure 1 : Concentration-Réponse et cinétique de la production d'inositols phosphates dans les cellules HEK 293 PAFR-HA

Figure 2 : Activité antagoniste et agoniste inverse du bromure d'octylonium

Figure 3: Activité antagoniste et agoniste inverse du BN5201

Figure 4: Activité antagoniste et agoniste inverse de PCA 4248

Figure 5: Activité antagoniste et agoniste inverse de WEB 2086

Figure 6: Activité antagoniste et agoniste inverse de CV 3988

Figure 7: Activité antagoniste et agoniste inverse de FR 49175

Figure 8: Activité antagoniste et agoniste inverse de TBTP Dioxolane

Figure 9 : Phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules HEK 293 PAFR-HA en fonction de la concentration de PAF

Figure 10 : Cinétique de la phosphorylation de ERK1/2 par le PAF

Figure 11 : Phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules HEK 293 PAFR-HA en présence du PAF et du bromure d'octylonium

Figure 12 : Phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules HEK 293 PAFR-HA en présence du PAF et de CV 3988

Figure 13 : Phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules HEK 293 PAFR-HA en présence du PAF et du TBTP dioxolane

Figure 14 : Phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules HEK 293 PAFR-HA en présence du PAF et du BN 52021

Figure 15 : Phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules HEK 293 PAFR-HA en présence du PAF et du WEB 2086

Figure 16 : Effet des modulateurs potentiellement allostériques sur la production d'inositols phosphates dans les cellules HEK293 PAFR-HA

Figure 17 : Effet des modulateurs potentiellement allostériques sur la phosphorylation de ERK 1/2 dans les cellules HEK 293 PAFR-HA

Figure 18 : Effet des modulateurs synthétiques sur la phosphorylation de ERK1/2 en présence de PAF dans les cellules HEK 293 PAFR-HA

Tableau 5. Essai de BRET avec les modulateurs potentiellement allostériques dans les cellules HEK 293 PAFR

Figure 19. Contrôle négatif de marquage extracellulaire du PAFR pour les différents surnageants d'hybridome

Figure 20. Contrôle positif de marquage extracellulaire du PAFR, CXCR4 et CysLT1 pour les différents surnageants d'hybridome.

Figure 21. Marquage extracellulaire du PAFR , CXCR4 et CysLT1 ainsi que les cellules HEK 293 avec le surnageant d'hybridome 9F5 1C1

Figure 22. Marquage extracellulaire du PAFR, CXCR4 et CysLT1 ainsi que les cellules HEK 293 avec le surnageant d'hybridome 9F5 1B4

Figure 23. Marquage extracellulaire du PAFR, CXCR4 et CysLT1, ainsi que les cellules HEK 293 avec le surnageant d'hybridome 9F5 1F8

Figure 24. Marquage extracellulaire du PAFR, CXCR4 et CysLT1 ainsi que les cellules HEK 293 avec le surnageant d'hybridome 9F5 1H4

Figure 25. Marquage extracellulaire du PAFR, CXCR4 et CysLT1 ainsi que les cellules HEK 293 avec le surnageant d'hybridome 9F5 2B3

Figure 26. Marquage extracellulaire du PAFR, CXCR4 et CysLT1 ainsi que les cellules HEK 293 avec le surnageant d'hybridome 9F5 2E4

Liste des abbréviations

BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfer

EGF : Epidermal growth factor

EGFR : Récepteur de l'EGF

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

GPCR : G-protein-coupled receptor

GRK : G-protein receptor kinase

GFP: green fluorescent protein

HA : Hémagglutinine

IP3 : Inositol 1,4,5- triphosphate

LTB4 : Leukotriene B4

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

NF- κ B : Nuclear factor-kappa B

NK : Natural killer

PAF : Platelet-activating factor

PAF-AH : PAF acéthylhydrolase

PAFR : Récepteur du PAF

PI3K : Phosphatidylinositol 3 kinase

PKC : Protéine kinase C

PLC : Phospholipase C

Rluc: Renilla luciferase

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

TBTB Dioxolane: Trans BTP Dioxolane

Résumé

Modulation orthostérique et allostérique du PAFR par des molécules synthétiques

Le PAF (facteur d'activation des plaquettes) est un médiateur lipidique de l'inflammation très puissant impliqué dans plusieurs conditions pathophysiologiques. Le PAF agit principalement via un seul récepteur, le PAFR qui appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G, les GPCRs. Le "two state model" assume que les GPCRs existent dans un état d'équilibre entre un état inactif (R) et un état actif (R*). L'isomérisation de R vers R* peut arriver de façon spontanée, c'est à dire indépendamment de la liaison d'un agoniste. Dans ces travaux de recherche, nous avons tenté de déterminer la propriété antagoniste et agoniste inverse des molécules orthostériques (WEB2086, PCA4248, FR49175, bromure d'octylonium, CV3988 et le Trans BTP dioxolane) à activer la voie des MAPK ainsi que le cycle biochimique des inositols phosphates dans la lignée cellulaire HEK 293 transfectée de façon stable avec le récepteur du PAF. De plus, l'activité potentiellement allostérique sur le PAFR de modulateurs synthétiques tels le THG-315, le THG-316 et MAREK a également été investiguée dans la même lignée cellulaire. Finalement, des surnageants d'hybridome 9H1/1C1, 9F5/1H4, 9F5/1H4, 9F5/1F8, 9F5/2B3 et 9F5/2E4 contenant des anticorps monoclonaux, dirigés tous contre un peptide qui équivaut à la région C-terminale de la troisième boucle extracellulaire du PAFR: GFQDSKfHQA ont également été utilisés, afin : 1) de déterminer le meilleur clone en terme d'affinité et de spécificité et 2) effectuer des tests pour savoir s'ils possèdent des propriétés agonistes ou antagonistes sur le PAFR. En conclusion, les résultats obtenus nous indiquent que :1) l'efficacité des molécules orthostériques à antagoniser les réponses induites par le PAF dépend de leur nature et de

leur concentration, 2) les modulateurs potentiellement allostériques utilisés ne modulent aucune des voies majoritairement connues pour être activées par le PAFR, et 3) qu'il n'y a aucun marquage spécifique du PAFR avec les surnageants d'hybridomes utilisés.

Mots clés: PAF (platelet activating factor)

PAFR (Platelet activating factor receptor)

GPCR (G protein coupled receptor)

Activation orthostérique

Modulateurs potentiellement allostériques

Introduction

Partie 1 : Facteur activant les plaquettes (PAF)

1.1 Structure du PAF

Durant les années 1960, il a été montré que les plaquettes de lapin pouvaient relâcher l'histamine par un mécanisme qui dépendait des leucocytes et des antigènes (BARBARO et ZVAIFLER.,1966). On pensait que ces leucocytes produisaient un facteur activement relâché par un processus dépendant de la température et du calcium. Plus tard, Benveniste et collaborateurs ont décrit une méthodologie afin d'obtenir cette molécule qui a été dénommée facteur activant les plaquettes communément appelé PAF (Platelet-activating factor) (BENVENISTE et al.,1972). En 1972, le PAF a été caractérisé, et ensuite il a été montré que cette molécule était relâchée par les basophiles de lapin (BENVENISTE et al.,1972) selon un processus dépendant des immunoglobulines IgE. Des études de structure en 1979 ont ensuite montré que le PAF était en fait un phospholipide connu sous le nom de 1-O alkyl-2-acetyl, *sn* glycerol-3 phosphocholine (Fig 1) (BENVENISTE et al., 1979). Quoique le PAF soit toujours le terme utilisé, ceci est un terme inapproprié, parce que ce terme l'identifie comme étant seulement un facteur capable d'activer les plaquettes. En plus d'être un médiateur intercellulaire, le PAF joue aussi un rôle de médiateur d'interactions intracellulaires. En effet quand le PAF est synthétisé par différents types cellulaires, il se lie à des récepteurs de la membrane plasmique d'autres cellules activées et change leur phénotype. Le PAF est aussi impliqué dans la transmigration des leucocytes dépendamment du type de stimulus activant les cellules endothéliales et de la localisation du PAF produit. En 1984, Prescott et al avaient émis l'hypothèse que l'adhésion des neutrophiles à des cellules endothéliales était activée par

la thrombine et l'expression du PAF à la surface des cellules endothéliales (PRESCOTT et al., 1984).

En plus d'être un facteur de signalisation intercellulaire, il a été proposé que le PAF pourrait avoir des effets autocrines et paracrines (BUSSOLINO et al., 1995). Aujourd'hui, le PAF est considéré comme étant un puissant phospholipide avec plusieurs effets physiologiques et pathophysiologiques.

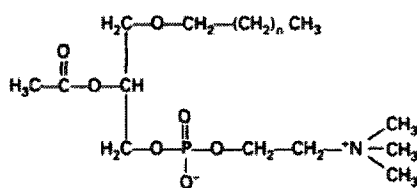


Fig 1 : Structure du PAF (BENVENISTE et al., 1974)

1.2 Biosynthèse du PAF

Trois voies différentes ont été proposées pour la production du PAF, notamment la voie de remodelage, la voie de synthèse de novo et la fragmentation oxydative (FEUERSTEIN et al., 1996) (Fig 2). La voie de remodelage désignée la plus importante se retrouve chez les cellules inflammatoires stimulées. Cette voie requière l'action de la phospholipase A2 et l'acétyl CoA transférase. L'activation de la phospholipase A2 résulte en l'hydrolyse des phospholipides membranaires pour générer une variété de 2-lysophospholipides, comme le lyso-PAF, qui est la cible de l'acétyl transférase. Cette enzyme catalyse le transfert d'un groupement acétyl à la fonction hydroxyle libre se trouvant à la position sn2 des lysophospholipides. Cette enzyme est présente dans le plasma et dans les tissus. Une seconde voie pour la biosynthèse du PAF est la voie de synthèse de novo. Cette

synthèse implique trois enzymes intervenant dans la conversion de 1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphate via l'acétylation, la déphosphorylation et le transfert de la choline. Cette voie donne lieu à 1-O-alkyl-2-acetyl-glycérol qui est ensuite converti en PAF par une glycéro cholinephosphotransférase spécifique. Cette voie est moins étudiée que celle du remodelage, mais elle est opérationnelle dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale (HELLER et al., 1991), les cellules de neuroblastome murin (HERRICK-DAVIS et al., 1991), dans les reins et dans le système nerveux central (LEE et al., 1989). Il a été suggéré que cette voie était impliquée dans la production du PAF selon des conditions physiologiques plutôt que pathologiques.

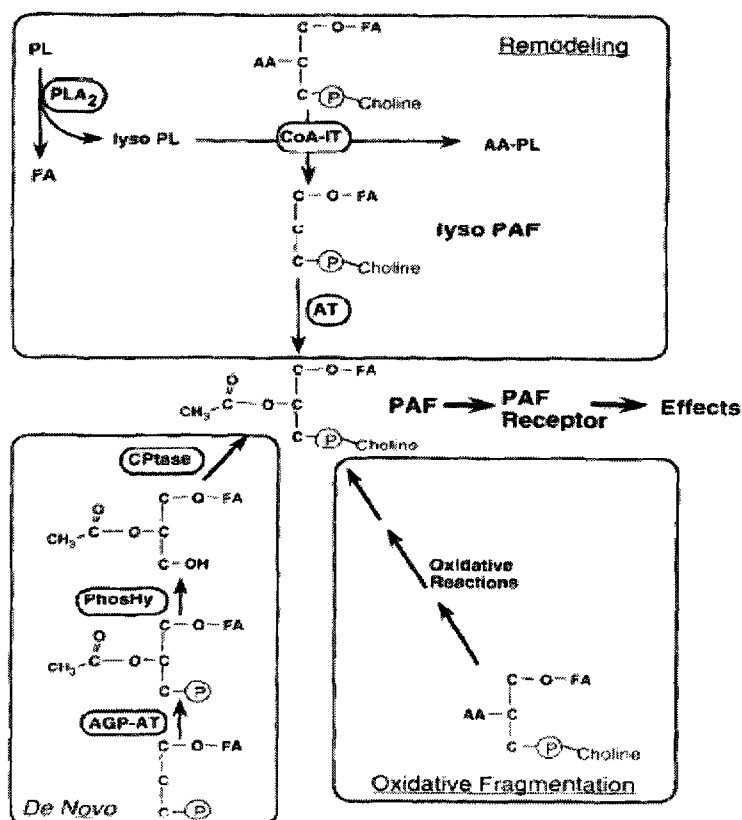


Fig 2 : Biosynthèse du PAF (FEUERSTEIN et al.,1996)

Des travaux analysant la fragmentation oxydative des phosphatidylcholines ont été réalisés. Quand il est exposé aux conditions oxydatives, le 1-0-alkyl-phosphatidylcholine contenant des groupements acyl gras insaturés à la position sn 2 peut se briser et engendrer une variété d'espèces de 1-0-alkyl phospholipides contenant différentes substitutions de chaînes courtes à la position sn 2 (SMILEY et al., 1991) (TANAKA et al., 1994). Ces molécules ont une bioactivité similaire à celle observée pour le PAF et leur activité peut être également bloquée par des antagonistes du récepteur du PAF. Ces données peuvent avoir une implication importante dans les maladies résultant de dommages oxydatifs (KUBES et al., 1990)

1.3 Dégradation du PAF

La dégradation du PAF se fait par l'hydrolyse du groupe acétyl à la position sn-2 pour générer le lyso-PAF et de l'acétate. L'enzyme catalysant cette réaction est le PAF acétylhydrolase (1-alkyl 2-acétyl-glycerophosphocholine esterase) (EC 3.1.1.47) (PRESCOTT et al., 2000). Des études ont montré qu'il pouvait y avoir différents isoformes sous forme soit sécrétée, soit intracellulaire. En plus du PAF, cette enzyme peut catalyser l'hydrolyse d'autres molécules biologiquement actives tels les phospholipides fragmentés de façon oxydative (STAFFORINI et al., 1996). D'après leur activité enzymatique, les PAF acétylhydrolases constituent le groupe VI des phospholipases A2, qui sont des enzymes considérées habituellement comme étant des initiateurs de transduction de signal; ces enzymes sont régulées par l'état d'activation de la cellule.

Les PAF acétylhydrolases ont été l'objet de plusieurs études cliniques en ce qui a trait aux maladies inflammatoires comme l'arthrite, le sepsis, les dommages pulmonaires et les maladies vasculaires. Certaines fois, des désordres associés à l'inflammation et aux réactions oxydatives libérant des radicaux libres ont été liés à une inhibition de l'activité enzymatique. Toutefois, les changements dans le taux global de l'activité des PAF acétylhydrolases demeurent difficiles à interpréter de façon précise, vu que le taux final de l'activité peut être le résultat de divers facteurs avec parfois des effets contraires. Une approche décisive dans la compréhension de l'enzyme a été l'utilisation d'une forme recombinante de l'enzyme dans les modèles expérimentaux de maladies humaines. Tjoelker et al ont été les premiers à montrer directement que les PAF acétylhydrolases avaient des propriétés anti-inflammatoires in vivo (TJOELKER et al., 1995). Ces auteurs ont montré que le PAF acétylhydrolase réduisait l'incidence du diabète en diminuant les taux de PAF dans les îlots de Langerhans, préservant les cellules β par l'inhibition des processus inflammatoires. Une déficience en PAF acétylhydrolase a été associée à une augmentation de l'asthme sévère et des maladies de l'artère coronaire chez les japonais (ICHIHARA et al., 1998)

1.4 Cellules produisant le PAF

Les origines cellulaires du PAF sont nombreuses, mais le PAF est principalement produit par les cellules impliquées dans le développement de réactions inflammatoires, comme les neutrophiles, les basophiles, les macrophages (Tableau 1). Suite à des stimuli appropriés, ces cellules sont capables de synthétiser du PAF. Les basophiles sensibilisés ainsi que les mastocytes relâchent le PAF en réponse à un antigène. Les monocytes et les

macrophages répondent à des stimuli phagocytaires comme les bactéries, les complexes immuns et le Ca^{2+} ionophore A23187. Quant aux neutrophiles, ils répondent aux esters de phorbol ainsi qu'à l'agent chimiotactique C5a. Les cellules endothéliales libèrent le PAF en réponse à la thrombine, la vasopressine, l'angiotensine II et l'interleukine 1. Il a été montré que les cellules endothéliales pouvaient également produire du PAF suite à une stimulation de différents médiateurs inflammatoires incluant la thrombine, l'angiotensine 2, le LTC 4, le LTD 4, l'histamine, la bradykinine, le TNF alpha, IL 8 et 21 (BRAQUET et ROLA-PLESZCZYNSKI., 1987). Le PAF produit par les cellules endothéliales n'est pas sécrété. Sur les cellules endothéliales, une fraction substantielle du PAF reste à la surface et dirige les interactions adhésives des cellules circulantes comme les neutrophiles. Les grands lymphocytes granulaires NK (natural killer) peuvent produire du PAF suite à leur stimulation du récepteur Fc et une série de lignées cellulaires de leucémie humaine comme les lignées cellulaires lymphoblastoïdes transformées avec le virus EBV. Les cellules qui produisent le PAF sont elles-mêmes des cibles du PAF.

Cellules et organes	Espèces	Réponse
Éosinophiles	Humain Humain Humain Humain Humain Bovin Cobaye	Production de superoxyde Transmigration par les cellules épithéliales Transmigration par le matrigel CD11b/CD18(Mac1) translocation, Dégranulation Relâche d'IL-8 Dégranulation, Polymérisation de l'actine Régulation à la hausse de Mac-1 et de la sélectine-L Production de superoxyde, TXB ₂ and LTC ₄
Neutrophiles	Humain	Production de superoxyde
Lymphocytes	Humain	Migration
J774A.1 lignée cellulaire de macrophage	Souris	Activation de NF-kB
JR-ST lignée cellulaire de cancer de l'estomac	Humain	Activation de NF-kB
BEAS-2B lignée cellulaire de l'épithélium bronchique	Humain	Activation de AP-1
Artère mésentérique	Rat	Vasodilatation
Artériole coronaire	Porc	Vasoconstriction hyperperméabilité
Artère pulmonaire	Furet	Vasodilatation
Veine pulmonaire	Furet	Vasoconstriction
Voies respiratoires	Cobaye Cobaye	Bronchoconstriction hyperréactivité
Trachée	Cobaye	Recrutement des éosinophiles, Hyperplasie cellulaire
Cellules épithéliales de la trachée	Humain Cobaye Chat	Augmentation de la perméabilité des éosinophiles Relâche de GM-CSF Relâche de l'acide arachidonique Métabolisme oxydatif des acides arachidoniques
Cellules endothéliales de la veine ombilique	Humain	Migration
Endomètre	Humain	Production de NO, Expression de VEGF, Activation de FAK
Fibroblastes pulmonaires	Humain	Expression de VEGF
Fibroblastes pulmonaires	Humain	Expression de <i>c-fos</i> , <i>c-jun</i> , IL-6 et IL-8

Tableau 1. Réponses induites par le PAF dans divers types de cellules et d'organes
Adapté de (ISHII et SHIMIZU., 2000)

1.5 Effets physiologiques et pathologiques du PAF

Le PAF est un phospholipide proinflammatoire puissant possédant divers effets pathologiques et physiologiques (Tableau 2). Ce phospholipide est impliqué dans plusieurs processus, entre autres l'inflammation physiologique, l'apoptose, l'angiogénèse, la reproduction (STAFFORINI et al., 2003). La question qui survient évidemment est comment un simple médiateur peut être impliqué dans une multitude d'événements différents? Premièrement, une variété de stimuli thrombotiques et inflammatoires activent les voies nécessaires qui régulent la synthèse du PAF. Deuxièmement, le récepteur du PAF est présent à la surface d'un grand nombre de cellules, ce qui rend possible l'interaction du PAF avec une variété de tissus et d'organes. Troisièmement, l'activation du récepteur de PAF génère des signaux de transduction utilisant différentes sous-populations de molécules effectrices et des voies de signalisation spécifiques à chaque type cellulaire.

En plus d'être un médiateur physiologique, un large éventail d'effets pathologiques est associé à un excès de l'accumulation du PAF. En théorie, les effets pathologiques pourraient être le résultat soit d'une synthèse excessive, soit d'une dégradation altérée du PAF. La plupart des membres de la famille de PAF, les phospholipides fragmentés de façon oxydative ou les lipides ressemblant au PAF produits d'une réaction oxydative non régulée, sont les conséquences d'une activation cellulaire ou l'exposition à des toxines oxydatives ou polluantes. Ces médiateurs lipidiques potentiels peuvent être produits à des temps inappropriés en de grandes quantités, par des cellules et des organes qui n'ont pas évolué pour générer et réguler des signaux du PAF. Il n'est donc pas surprenant que les

bases moléculaires des maladies associées à un excès d'accumulation du PAF pourraient être également dûes à une dégradation incorrecte du PAF.

Effets physiologiques et pathophysiologiques du PAF

- Cellules sanguines
 - Aggrégation et sécrétion plaquettaire
 - Chimiotaxie et activation des neutrophiles
 - Chimiotaxie et activation des éosinophiles
 - Activation des macrophages et des monocytes
 - Stimulation des lymphocytes B
- Corps humain
 - Inflammation accrue
 - Désordres allergiques
 - Choc endotoxique
 - Choc anaphylactique
 - Coagulation intravasculaire disséminée
- Système nerveux central
 - Plasticité synaptique
 - Dommages du cerveau ischémique
 - Convulsion
- Système cardiovasculaire
 - Hypotension
 - Bradycardie
 - Effet inotropique négatif (muscle cardiaque)
 - Ischémie myocardiale
- Système respiratoire
 - Bronchoconstriction
 - Hyper-réactivité bronchique
 - Asthme bronchique
 - Dommages pulmonaires accrus
- Système gastro-intestinal
 - Contraction du tractus gastro-intestinal du muscle lisse
 - Glycogénolyse dans le foie
 - Ulcère peptique
- Rein
 - Prolifération des cellules mésangiales
 - Inhibition de la libération de rénine
- Système reproductif
 - Ovulation
 - Implantation de l'ovule
 - Stimulation de l'embryon

Tableau 2. Effets physiologiques et pathophysiologiques du PAF. Adapté de (IZUMI et SHIMIZU., 1995)

Partie 2: Récepteur du facteur d'activation des plaquettes (PAFR)

2.1 : Caractérisation du PAFR

Le PAF exerce ses effets via un récepteur spécifique, le PAFR (Platelet activating factor receptor). Le récepteur de PAF a été cloné chez plusieurs espèces dont la souris (ISHII et al., 1996), le porc, l'humain (NAKAMURA et al., 1991) dans les années 1990, et l'analyse par séquençage indique que ce récepteur appartient à la classe A de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (ISHII et SHIMIZU., 2000) (Figure 3). Le PAFR humain (IZUMI et SHIMIZU., 1995) possède 342 acides aminés et son poids moléculaire prédit est de 39000 Da. Le gène de PAFR humain (hPAFR) se situe sur le chromosome 1p35-p34.4 et est caractérisé par l'absence d'introns dans sa région codante (SEYFRIED et al., 1992). Deux sites potentiels de N-glycosylation selon l'espèce et un site potentiel de palmitoylation au niveau du résidu cystéine 316 ou 317 en C-terminal sont présents sur le PAFR. Neuf résidus Ser/Thr seraient également présents dans la queue C-terminale du PAFR et quelques uns de ces résidus sont impliqués dans la liaison des GRKs (G-protein receptor kinases) (IZUMI et SHIMIZU, 1995). Une autre étude mentionne qu'il y aurait des sites importants dans la queue C-terminale pour la désensibilisation du récepteur induite par l'agoniste (TAKANO et al., 1994)

Le gène du PAFR génère 2 transcrits différents soit le transcrit 1 et le transcrit 2. Le transcrit 1 est présent de façon ubiquitaire et est plus abondant dans les leucocytes périphériques. Le transcrit 1 semblerait jouer un rôle majeur dans les réactions inflammatoires. Le promoteur du transcrit 1 possède une séquence consensus pour le facteur de transcription NF- κ B, SP-1, et INR.

Le transcrit 2 est présent dans le cœur, les reins, la rate mais pas dans les leucocytes. La transcription du second transcrit requière un site AP-1 et peut être induite par des esters de phorbol, mais non par le PAF. Le second transcrit peut être aussi régulé par l'acide rétinoïque et l'hormone thyroïdienne, l'œstrogène et le TGF β (PRESCOTT et al., 2000). Le contrôle majeur de l'expression du récepteur du PAF est au niveau transcriptionnel, mais notre laboratoire a observé que le taux de l'ARNm du récepteur du PAF dans les monocytes humains diminuait en réponse au PKC et que la demi-vie de l'ARNm avait grandement diminué. Notre laboratoire a donc conclu que la stabilité de l'ARNm serait également un autre mécanisme régulateur potentiel de l'expression du PAFR (THIVIERGE et al., 1996)

```

1  MEPHDSSHMD SEFRYTLFPI VYSIIFVLGV IANGYVLWVF ARLYPCKKFN EIKIFMVNL
61  MADMLFLITL PLWIVYYQNN GNWILPKFLC NVAGCLFFIN TYCSVAFLGV ITYNRFQAVT
121 RPIKTAQANT RKRGISLSLV IWVAIVGAAS YFLILDSTNT VPDSAGSGNV TRCFEHYEKG
181 SVPVLIHIF IVFSFFLVFL IILFCNLVII RTLLMQPVQQ QRNAEVKRRR LWMVCTVLAV
241 FIICFVPHHV VQLPWTLAEL GFQDSKFHQA INDAHQVTLC LLSTNCVLDP VIYCFLTKKF
301 RKHLTEKFYS MRSSRKCSRA TDTVTVEVVV PFNQIPGNSL KN

```

Fig 3: Séquence en acides aminés du PAFR humain.
(NAKAMURA et al., 1991)

Le couplage sélectif du PAFR avec les protéines G hétérotrimériques a été étudié selon diverses approches. La production de différents mutants du récepteur du PAF par diverses équipes a permis de comprendre son couplage aux protéines G, sa liaison au ligand, sa signalisation et ses états d'activation. Deux revues complètes explorent grandement les différentes mutations du PAFR (HONDA et al., 2002; PRESCOTT et al., 2000). En résumé, les résidus histidines 188, 248 et 249 formeraient une pochette pour la

liaison du PAF, la cystéine 95 serait importante pour une fonction optimale du récepteur et les résidus phénylalanines 97 et 98 seraient impliqués dans la conformation du récepteur. Les mutations N100A et L231R confèrent un phénotype constitutivement actif au PAFR. À l'inverse, les mutations D289A et A230E/Q rendent le PAFR inactif sans toutefois affecter sa liaison au PAF. Notre laboratoire a également montré que l'association de la β arrestine 2 avec le récepteur était dépendante de la région comprise entre la thréonine 305 et la valine 330, parce que l'arrestine 2 pouvait être immunoprécipitée avec le mutant PAFR stop 330 (dont la séquence en acides aminés s'arrête à la position 330), et non avec le PAFR 305 (CHEN et al., 2000).

2.2 Signalisation par le PAFR

Plusieurs mécanismes régulent le système de signalisation intercellulaire du PAF

- Les voies de synthèse
- La régulation spatiale
- La disponibilité biologique du PAF
- L'expression du PAFR
- La désensibilisation homologue et hétérologue du PAFR
- La dégradation rapide du PAF par des acétylhydrolases intra et intercellulaires

Comme tous les membres de la superfamille de récepteurs couplés aux protéines G, le PAFR peut se lier et activer plusieurs sous types de ces protéines hétérotrimériques. Le récepteur de PAF peut se coupler aux sous-unités G α i, G α o, G α q/11 selon le type cellulaire (DUPRÉ et al., 2001; VAN BIESEN et al., 1996). Dépendamment du type cellulaire, l'activation des protéines G peut induire un large éventail d'effets incluant

entre autres l'adhésion, la polarisation et la motilité cellulaires, l'expression génique (MARINISSEN et GUTKIND., 2001).

Il est apparu clairement qu'un des événements principaux dans les mécanismes de signalisation médiés par le PAF est l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate, par une phospholipase C fournissant deux seconds messagers, soit le diacylglycerol (DAG) et l'inositol 1.4.5 phosphate (IP3). Le DAG active certaines isoformes de la protéine kinase C menant à la phosphorylation des divers substrats de ras GRP (YANG et al., 2007), de certains canaux TRP (HARDIE., 2007) et des chimiokines (KAZANIETZ., 2002) tandis que le IP3 mobilise le calcium intracellulaire (BERRIDGE et al., 2003). Le "turnover" des phospholipides ainsi que l'augmentation du calcium intracellulaire peuvent être bloqués par des analogues de GTP, mais en présence de la toxine pertussique, ces deux réponses sont différentes, ce qui suggère qu'il y aurait deux protéines G distinctes en aval du PAFR.

Honda et collaborateurs ont utilisé des cellules transfectées de façon stable afin d'étudier la capacité de PAF à activer les MAPK (Mitogen Activated Protein kinase). Ils ont pu conclure que les deux formes de 42 et 44 kDa de la protéine ERK étaient phosphorylées quand les cellules étaient exposées au PAF (HONDA et al., 1994). La voie des MAPK peut être activée dans plusieurs types cellulaires, incluant les cellules épidermales (MARQUES et al., 2002), ainsi que les cellules de type CHO (TANAKA et al., 1994) et HEK 293 (CHEN et al., 2003), lorsque transfectées avec un plasmide codant pour le PAFR. Parmi les MAPK connues, ERK1/2, p38 et JNK sont activées (NICK et al., 1997) par une stimulation au PAF. Dépendamment du type cellulaire, le patron d'activation peut varier. L'activation de MAPK passerait par la protéine kinase C (PKC) et se ferait

selon une voie différente de la petite GTPase ras dans les fibroblastes (HONDA et al., 1994, VAN BIESEN et al., 1996). Dans notre laboratoire, il a été montré que l'activation de ERK1/2 était indépendante de la trans-activation du récepteur de l'EGF (EGFR) dans les cellules HEK293, en plus d'être indépendante de l'internalisation du récepteur ainsi que de l'activation des protéines G (CHEN et al., 2003).

La voie JAK/STAT n'est pas seulement unique aux récepteurs de cytokines. Des études ont montré que cette voie pourrait être également impliquée dans la signalisation via certains GPCRs dont le récepteur du PAF. Contrairement aux récepteurs de cytokines, l'association de JAK 2 avec les GPCRs a lieu uniquement après la liaison de l'agoniste, excepté dans le cas du PAFR. Des recherches effectuées dans notre laboratoire ont montré que Tyk2 était associé de façon constitutive avec le PAFR (LUKASHOVA et al., 2001). Les régions du récepteur impliquées dans l'association de Jak 2 ont été seulement étudiées dans un nombre restreint de GPCRs, où il a été montré que le motif DRY dans la seconde boucle intracellulaire du récepteur CCR2B (MELLADO et al., 1998), et le motif riche en proline YIPP, dans la queue C-terminale du récepteur de l'angiotensine AT1 (ALI et al., 1997). De récentes études ont par contre montré que l'association de Jak2 avec le récepteur AT1 était indirecte et était due à la protéine tyrosine phosphatase 2 SH (SHP2) qui agirait comme une protéine d'échafaudage (MARRERO et al., 1998). Notre laboratoire a montré que PAFR pouvait activer Jak 2 indépendamment des protéines G et du mécanisme d'internalisation. L'association de Jak 2 avec le PAFR est dépendante du ligand et requiert la présence de Tyk 2 catalytiquement active. L'extrémité C terminale contient des domaines importants pour l'activation de JAK 2. Les membres de la famille

des JAK sont connus pour être associés de façon constitutive avec les récepteurs de cytokines et deviennent activés par auto et ou transphosphorylation après la liaison de la cytokine au domaine extracellulaire du récepteur. Récemment, notre laboratoire a montré que Tyk 2 qui est associé de façon constitutive au PAFR, était essentiel pour l'activation induite par PAF. PAF induit une activation rapide de Tyk 2 indépendante des protéines G dans la lignée cellulaire myéloïde Mono-mac1 et dans un système de cellules transfectées. Le PAFR régule également plusieurs autres molécules de signalisation telles que la phospholipase A2, la phospholipase D (PLD), la phospholipase C (PLC), des petites protéines G (IZUMI et SHIMIZU., 1995)

2.3 Désensibilisation du récepteur du PAF

Comme les autres GPCRs, le récepteur du PAF est désensibilisé après son activation initiale. La désensibilisation du PAFR peut avoir lieu soit par désensibilisation homologue ou hétérologue. La désensibilisation homologue peut se faire de deux façons soit par la phosphorylation du récepteur, probablement par une GRK (G-protein-coupled receptor kinase 1) ou par l'inactivation des effecteurs PLC- β 3 en aval par les PKC (ALI et al., 1994). La désensibilisation hétérologue se fait par un troisième mécanisme qui est la phosphorylation du récepteur par les PKC ou les PKA (RICHARDSON et al., 1996). La désensibilisation du PAFR est liée à son internalisation. Suite à la stimulation par un agoniste l'internalisation du récepteur du PAF dépendrait des arrestines, mais serait indépendante de l'activation des protéines G (CHEN et al., 2002). La queue C terminale serait un élément très important pour l'internalisation; en effet la phosphorylation de la queue C terminale faciliterait la séquestration du récepteur à la surface cellulaire, par contre cette phosphorylation ne serait pas essentielle (LE GOUILL et al., 1997).

2.4 Antagonistes du PAFR

De nombreux efforts ont été réalisés pour le développement et la caractérisation d'antagonistes spécifiques du récepteur du PAF. La compréhension de l'implication du PAF dans plusieurs dommages pathophysiologiques a été considérablement facilitée par la découverte de différents antagonistes du PAFR. Un certain nombre d'antagonistes naturels du PAFR a été identifié comme le BN52021 (LACHACHI et al., 1985) et le Kadsurenone isolés de *Ginkgo Biloba* et de *Piper futokadsurae* respectivement. Des antagonistes synthétiques du PAFR ont été développés incluant

- 1) des analogues de phospholipides comme le FR 72112, le CV 3988, le CV 6209, le ONO 6240, le RP 48740
- 2) des dérivés de triazolobenzodiazepine comme le BN 50726, WEB 2086 (CASALS-STENZEL et al., 1986), BN 50739
- 3) des dérivés de Tétrahydrofurane comme le L-652731

Il est plus intéressant d'utiliser des antagonistes synthétiques du PAF vu la plus grande facilité à les synthétiser et leur grand potentiel d'inhibition dans les réponses induites par le PAF. En pharmacologie, les composés ont le plus souvent été caractérisés par leur habileté à inhiber la liaison du PAF à son récepteur, ou à antagoniser les réponses spécifiques induites par le PAF comme l'agrégation plaquettaire par exemple. Certains des antagonistes du PAFR ont été utilisés dans quelques cas de maladies inflammatoires (PEPLOW, 1999). Un résumé de leurs effets est dressé au tableau 3.

Le plus souvent des antagonistes peuvent aussi se comporter comme des agonistes inverses. Dans notre laboratoire, il a été montré que le WEB 2086 pouvait également se comporter comme un agoniste inverse (DUPRÉ et al., 2001). Des résultats de notre

laboratoire ont également montré que le WEB2086 pouvait induire l'activation de PKC tout comme le PAF, cependant les isozymes activés par les deux ligands sont différents (DUPRÉ et al., 2007).

Disease/disorder	Model/species	Antagonist	Parameters affected
Cardiovascular disease vascular disease	Cigarette-smoke exposure; hamster	WEB 2170	Inhibition of leukocyte adhesion to vascular wall and formation of leukocyte-platelet aggregates
Respiratory disease Asthma	Human	SR-27417A	Attenuated the late asthmatic response, allergen-induced airway responsiveness, or baseline lung measurements
Asthma	Human	WEB2086	Reduction in inhaled corticosteroid dosage during treatment phase
Mild and moderate asthma	Human	WEB 2086	Higher clinical improvement than after treatment with placebo
Digestive disease TNB-induced colitis	Isolated left colon perfusion intra-colonic administration of TNB; rabbit	WEB 2170	Inhibition of PAF release
Renal disease Renal ischemia	Experimental interruption of blood flow to both kidneys; rat	Ro-24-4736	Renal function less impaired and histological abnormalities less pronounced compared with postischemic kidneys from vehicle-treated animals
	4h cold renal ischemia/reperfusion in presence of neutrophils; rat	BN 52021	Increased plasma flow rate, GFR and Na ⁺ reabsorption compared to kidneys reperfused without antagonist
Pancreatic disease Acute pancreatitis	Human	Lexipafant	Reduced incidence of organ failure and total organ failure at the end of treatment
Acute pancreatitis	Pancreatitis induced by microvascular ischemia male rat	BB 882	Reduced the rise in serum amylase activity compared with controls and improved pancreatic histology score
Diabetes	Alloxan-induced diabetes mouse	SR-27388	Antagonist protected against alloxan-induced diabetes
Immunologically-related disease Rheumatoid arthritis	Human	BN-50730	Improvement of clinical indicators when antagonist given at 40 mg*2/day for 28 days; no improvement in clinical and biological indicators when antagonist given at 40 mg*2/day for 84 days
Systemic inflammatory response syndrome Lung injury	Postperfusion lung injury following cardiopulmonary bypass; dog	CV-3988	Antagonist had protective effect
Sepsis	endotoxin-induced sepsis; rat	SM-12502	Antagonist prevented endotoxin-induced increases in pulmonary vascular permeability and histological changes
Sepsis	endotoxin-induced sepsis; mouse	SR-27388	Antagonist provided complete protection against endotoxin-induced lethality
Gram negative sepsis	Human	BN-52021	Antagonist reduced the mortality

Tableau 3. Effets de différents antagonistes du PAFR. (PEPLOW, 1999)

Partie 3 : État d'activation des GPCRs

3.1 Équilibre des GPCRs

Le “ two state model ” assume que les GPCRs existent dans un état d'équilibre entre un état inactif (R) et un état actif (R*). À l'état inactif, les GPCRs ne sont pas couplés aux protéines G, tandis à l'état actif, les GPCRs peuvent se coupler et activer les protéines G (SEIFERT et WENZEL-SEIFERT, 2002). L'isomérisation de R vers R* peut se produire de façon spontanée, c'est à dire indépendamment de la liaison d'un agoniste. Les agonistes stabilisent l'état R* des GPCRs et poussent donc l'équilibre vers l'état actif. Ce changement de conformation associé à l'isomérisation de R vers R* permet la dissociation des GDP des protéines G, l'étape limitante du cycle des protéines G. Un agoniste augmente de façon efficace le taux basal d'échange GDP/ GTP des protéines G et l'activité des systèmes effecteurs. Les agonistes partiels sont moins efficaces que les agonistes à stabiliser l'état actif R* des GPCRs, et donc, ils augmentent de façon moins efficace le taux d'échange GDP/GTP. À l'inverse des agonistes complets, les agonistes inverses poussent l'équilibre des GPCRs vers l'état inactif. Ils diminuent le niveau basal du taux d'échange GDP/GTP. Les composés jouant le rôle d'agonistes inverses ont une plus grande affinité pour l'état inactif comparativement à la conformation active. Ce qui résulte en une diminution de la proportion de récepteurs dans une conformation active et une réduction dans l'activation basale des mécanismes effecteurs. Les agonistes inverses partiels sont moins efficaces que les agonistes inverses complets. Les antagonistes neutres n'altèrent pas l'équilibre entre l'état inactif R et l'état actif R*. Ils ne changent pas non plus l'activité basale des GPCRs, mais ils bloquent les effets inhibiteurs des agonistes inverses ainsi que les effets stimulants des agonistes. En absence d'un agoniste,

un antagoniste ne stabilise pas préférentiellement l'un ou l'autre état d'activation d'un GPCR.

Étudier les relations entre la structure d'un ligand et ses propriétés peut permettre de prédire les effets secondaires de celui-ci lors d'une thérapie ainsi que de développer certaines molécules avec les caractéristiques désirées, comme par exemple des ligands pouvant induire une désensibilisation à court ou long terme sans pour autant induire des cascades effectrices indésirables.

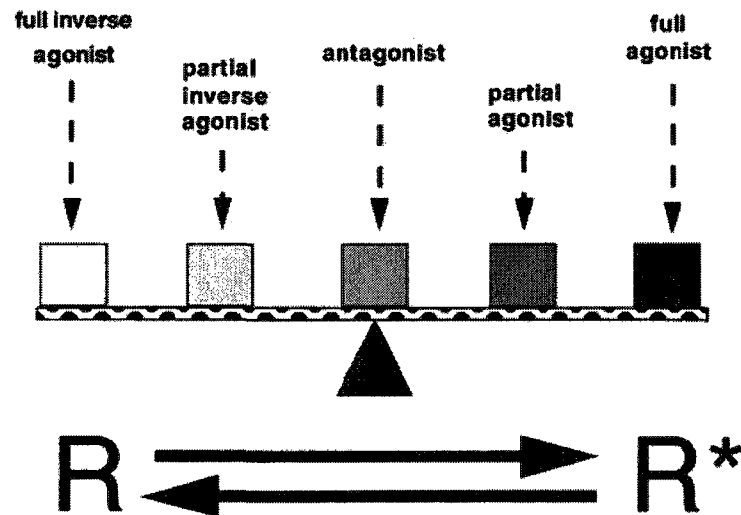


Fig 3: État d'équilibre des GPCRs (SEIFERT et WENZEL-SEIFERT, 2002)

3.2 Concept d'allostérie

Le comportement allostérique a été longtemps étudié en biologie bien avant que le terme d'allostérie soit utilisé. Plusieurs concepts ont émergé des études d'allostérie. L'un de ces concepts a été principalement étudié dans le domaine de l'enzymologie, selon lequel plusieurs protéines peuvent avoir plus d'un site de liaison. En effet des études de Bohr sur l'hémoglobine avaient révélé que la protéine pouvait lier simultanément plus d'une

molécule d'oxygène, un phénomène alors nommé coopérativité (BOHR, 1904). En ce qui a trait aux GPCRs, il existe un autre concept relevant de la régulation allostérique. Les GPCRs peuvent migrer à l'intérieur de la cellule et interagir avec d'autres molécules afin de transmettre le stimulus externe à la cellule. Les sites d'interaction du GPCR avec l'agoniste et les protéines intracellulaires sont différents et distincts d'un point de vue topographique. De ce fait, les GPCRs seraient naturellement allostériques parce qu'ils possèdent plus d'un site de liaison. De définition exacte, une molécule allostérique est une molécule qui se lie à un site différent du site de liaison de l'agoniste endogène (MAY et al., 2004)

Partie 4 : But de l'étude

À date, la majorité des efforts pour découvrir des médicaments ciblant les GPCRs ont été de développer des ligands sélectifs se liant sur le site de liaison orthostérique du récepteur. De ce fait, la plupart des médicaments disponibles sur le marché sont soit des agonistes, des antagonistes neutres, ou des agonistes inverses, tous orthostériques (MAY et al., 2004). L'action des drogues qui agissent via le site orthostérique des GPCRs dépend de l'affinité des composés pour le récepteur. Ainsi, un agoniste orthostérique induira un état activé et un antagoniste, un état neutre. Ces deux types de ligands sont en général insensibles aux fluctuations du taux du ligand endogène. Par conséquent, les ligands orthostériques peuvent être associés à de la toxicité et à la régulation à long terme à la hausse ou à la baisse de l'expression du récepteur (MAY et al., 2007).

Il existe évidemment plusieurs avantages intéressants à utiliser des agonistes allostériques, comme par exemple leurs propriétés sélectives vis à vis de certains

récepteurs. Ceci pourrait être expliqué par l'affinité sélective pour un site de liaison non conservé ou par une signalisation sélective; les agonistes allostériques en provoquant des changements de conformation unique, peuvent activer seulement certaines voies de signalisation cellulaire comme, par exemple, le couplage à certains effecteurs mais pas la désensibilisation. L'utilisation des agonistes allostériques pourrait être également bénéfique dans le domaine clinique par la combinaison de thérapies dans certains désordres. Par exemple, le blocage du récepteur de chimiokine CXCR4 a été une arme puissante pour combattre l'infection par le VIH, par contre cette thérapie peut occasionner plusieurs effets sévères, étant donné que le CXCR4 est impliqué dans le transport des lymphocytes, des monocytes et des cellules souches hématopoïétiques. Le développement de l'antagoniste du CXCR4, AMD300 a dû être suspendu, parce que cette molécule induisait une toxicité cardiaque (BLEUL et al., 1996). Une façon de contourner cet inconvénient est l'utilisation d'agonistes allostériques qui exercent une activité neutralisante en présence d'antagonistes orthostériques pour ne conserver que le blocage de liaison au VIH (SACHPATZIDIS et al., 2003). Un bel exemple de coopérativité!

4.1 Objectifs et hypothèse de recherche

Au cours de nos travaux de recherche, nous avons tenté d'étudier la régulation du PAFR par des composés orthostériques (Tableau 4), des modulateurs potentiellement allostériques et des surnageants d'hybridomes. La modulation du PAFR par les molécules orthostériques utilisées dans ces travaux avait déjà été étudiée dans notre laboratoire (DUPRÉ et al., 2001). Dans ces travaux de recherche, notre premier objectif a donc été

de comparer les voies de signalisation induites suite à l'activation du PAFR par ces molécules orthostériques avec les modulateurs potentiellement allostériques.

Les modulateurs potentiellement allostériques sont des D-peptides, et proviennent du laboratoire de synthèse de l'université McGill. Ces modulateurs correspondent à différentes régions du PAFR. Il s'agit du THG 315 (NH₂-YEKGSVPVL-COOH) à la position 177-185, du rétropeptide THG 315 (NH₂-LVPVSGKEY-COOH), du THG 316 (NH₂-LPWTLAEL-COOH) à la position 253-260, du rétropeptide THG 316 (NH₂-LEALTWPL-COOH) et Marek-1 (NH₂-SAGSGNVTRS-COOH) à la position 164-173. L'intérêt à considérer différentes régions du PAFR vient du fait qu'il existe des interactions intra-récepteur ayant pour but de stabiliser des conformations précises du récepteur, et garder le récepteur dans une structure fonctionnelle ou non. En ciblant ainsi plusieurs régions du récepteur, les probabilités de trouver une molécule capable d'interférer avec l'interaction de deux régions, ou de deux boucles du récepteur, qui seraient impliquées dans la stabilisation d'une conformation active, inactive ou même neutre sont augmentées.

L'utilisation d'un peptide interagissant avec une région, impliquée dans l'interface entre deux monomères de récepteurs (qui forment un oligomère fonctionnel du récepteur), pourrait affecter des états de transition dans l'activation du récepteur ou affecter l'affinité pour l'agoniste en changeant la structure du récepteur. Les THG tous dérivés de la jonction de la boucle et de la région transmembranaire pourraient augmenter les chances de susciter un tel phénomène. Il est important de noter que les peptides n'étaient pas uniquement dérivés des régions transmembranaires, car des peptides trop hydrophobes ne

possèderaient pas de bonnes propriétés (problème de dissolution, d'agrégation) de ligands dans un milieu aqueux comme un milieu cellulaire. Le peptide Marek1 a été synthétisé car il a été montré qu'un anticorps contre cette région du récepteur agit comme un agoniste du PAFR en terme d'induction de flux calcique (MULLER et al., 1993).

Plusieurs études ayant le même principe de l'utilisation de petits peptides dirigés contre une région de récepteur supportent notre démarche. Les études de Peri et collaborateurs ont montré que le peptide THG 113, un antagoniste non sélectif du récepteur FP est capable de retarder le travail prématuré lors de l'accouchement (PERI et al., 2002). Les études de Brault et collaborateurs ont montré que le THG 1603, un antagoniste du récepteur du LPA₁ est capable d'empêcher la mort cellulaire induite par le LPA in vitro, ex vivo et in vivo (BRAULT et al., 2006), et finalement dans les études de Hou et collaborateurs, il a été montré que la vasoconstriction des tissus cérébraux est fortement diminuée suite au prétraitement de ces tissus avec un antagoniste du récepteur de la thromboxane, le L-670596, ainsi que le THG 315, un antagoniste du récepteur du PAF (HOU et al., 2003). En ce qui a trait aux modulateurs potentiellement allostériques, nous nous sommes donc basés sur les travaux de Hou et collaborateurs (HOU et al., 2003) au cours desquels les auteurs ont utilisé le THG 315, qui est l'un des peptides prototypes que nous avons utilisés. Nous utilisons des analogues D-peptides au lieu de L-peptides parce que ces peptides sont beaucoup plus résistants à la dégradation par des peptidases tissulaire et plasmatique, contrairement aux L-peptides.

Notre deuxième objectif a été de caractériser ces modulateurs en ce qui a trait à leurs propriétés agonistes, agonistes inverses ou antagonistes et aussi, de déterminer si elles

induisaient une signalisation sélective du PAFR, à savoir si ces molécules étaient capables d'activer seulement l'une ou l'autre des voies majeures connues pour être activées par le PAF, telles que la voie des MAPKs, le cycle biochimique des inositols phosphates et la voie Jak/Stat.

Les surnageants d'hybridome 9H1/1C1, 9F5/1H4, 9F5/1H4, 9F5/1F8, 9F5/2B3 et 9F5/2E4 sont dirigés tous contre le peptide 9F5 qui équivaut à la région C-terminale de la troisième boucle extracellulaire du PAFR: GFQDSKFHQA. Ces surnageants d'hybridomes proviennent du laboratoire du Dr Uri Saragovi de l'Université de Montréal. Ce sont des anticorps dirigés contre le même peptide, mais ils sont des clones distincts. Notre troisième objectif a été de déterminer le meilleur clone en terme d'affinité et de spécificité afin d'en produire en plus grande quantité, et finalement effectuer des tests pour savoir s'ils pouvaient moduler ou non l'activité du récepteur du PAF, ceci se basant sur le fait qu'il a été montré dans notre laboratoire qu'un anticorps agissait comme un agoniste du PAFR en terme d'induction de flux calcique (MULLER et al., 1993)

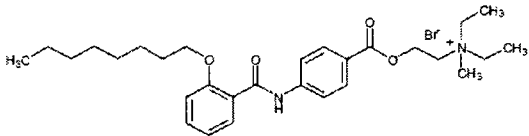
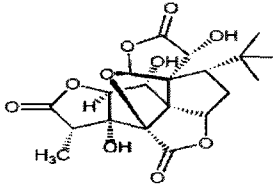
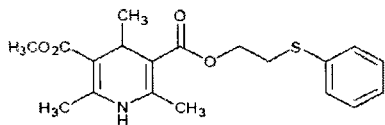
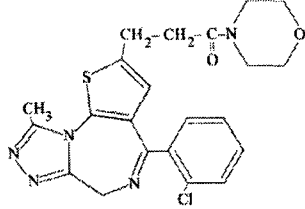
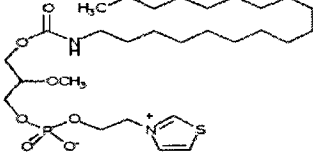
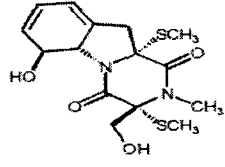
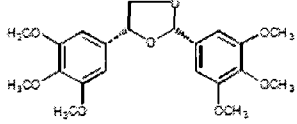
Bromure d'octylonium	
BN 52021	
PCA 4248	
WEB 2086	
CV 3988	
FR 49175	
Trans BTP Dioxolane	

Tableau 4 : Molécules orthostériques utilisées.

Partie 5 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

5.1 PRODUITS UTILISÉS

Anticorps anti ERK: lapin anti C-term ERK, Santa Cruz, LaJolla, USA

Anticorps anti ERK (pYERK): souris anti-pY204, Santa Cruz, LaJolla, USA

Anticorps secondaire: IgG de chèvre anti Ig lapin, couplé FITC (fluorescéine isothiocyanate) :

Anticorps secondaire : anti Ig de souris couplé HRP (*horseradish peroxidase*) : Amersham Biosciences, Baie D'Urfé, Canada

Anticorps secondaire: anti Ig de lapin couplé HRP : Amersham Biosciences, Baie D'Urfé, Canada

Acide okadaic : inhibiteur de tyrosine phosphatase type 1 et 2A; Sigma-Aldrich, Oakville, Canada

Acide formique 88%: Fisher Scientific, Nepean, Canada

Aminoethyl benzenesulfonyl fluoride-AEBSF: Sigma-Aldrich, Oakville, Canada

Ammonium formate: Fisher Scientific, Nepean, Canada

Aprotinine : Roche Diagnostics, Laval, Canada

BSA : *bovine serum albumin* – albumine sérique de bœuf; Sigma-Aldrich, Oakville, Canada

Calyculine A: Biomol, Cedarlane, Hornby, Canada

Deep Blue C: Perkin Elmer, Canada

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle medium*, Invitrogen, Burlington, Canada

Ethylenediamine-tetraacetic acid - EDTA: Sigma-Aldrich, Oakville, Canada

Ethylene glycol-tetraacetic acid - EGTA: Sigma-Aldrich, Oakville, Canada

Fœtal bovine serum – FBS: Sigma-Aldrich, Oakville, Canada

Glycine: Sigma-Aldrich, Oakville, Canada

Lait en poudre écrémé Carnation : Nestlé, Canada

MgSO₄: Fisher Scientific, Nepean, Canada

myo-[³H]-inositol: Amersham Biosciences., Baie d'Urfé, Canada

PAF: Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA

Péniciline: Sigma-Aldrich, Oakville, Canada

Streptomycine: Sigma-Aldrich, Oakville, Canada

TransIT-Lt1: MirusBio, Fisher Scientific, Nepean, Canada

Tris base: Sigma-Aldrich, Oakville, Canada

Triton X-100: Fisher Scientific, Nepean, Canada

Biomol

cat: L122-0001 ; BIS(Methylthio)Gliotoxin (=FR-49175)

cat: L131-0005 ; Octylonium Bromide

cat: L103-0005 ; CV-3988

cat:L133-0010 ; PCA-4248

cat:L135-0010 ; Ginkgolide B (=BN52021)

Tocris Cookson Inc.

cat: 2339/10 ; WEB 2086

Alexis Biochemicals

cat: ALX-301-001-M025; PAF (C16)

cat: ALX-301-010-M005; PAF (C16), Carbamyl-PAF

Cayman Chemical Co.

cat: 60950-1; trans-BTP Dioxolane

GenScript

THG 315 (NH₂-YEKGSVPVL-COOH)

THG 315 a (NH₂-LVPVSGKEY-COOH)

THG 316 (NH₂-LPWTLAEL-COOH)

THG 316 a (NH₂-LEALTWPL-COOH)

MAREK (NH₂-SAGSGNVTRS-COOH)

Laboratoire du Dr Saragovi (Université de Montréal)

9H1/1C1

9F5/1H4

9F5/1H4

9F5/1F8

9F5/2B3

5.2 MATÉRIEL UTILISÉ

Film de chemiluminescence: General Electric Amersham Biosciences., Baie d'Urfé,
Canada

Cytomètre en flux : FACScan, BD Biosciences, Mississauga, Canada

Spectrofluoromètre: SLM/Aminco spectrofluorometer, SLM Instruments, Urbana, USA

Kit d'extraction GeneClean: Quiagen, Mississauga, Canada

Kit Wizard: Promega, Fisher Scientific, Nepean, Canada

Membrane nitrocellulose: Bio-Rad, Mississauga, Canada

Pétris de culture de 100 mm: Sarstedt, Montréal, Canada

Pétris de culture de 100 mm (pour culture de HUVEC) : Fisher Scientific, Nepean,
Canada

Plaque de culture de 6 puits : Fisher Scientific, Nepean, Canada

Plaque de culture de 12 puits : Fisher Scientific, Nepean, Canada

Partie 6 : TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

6.1 CELLULES ET STIMULATION

Lignée cellulaire HEK 293

La lignée cellulaire HEK 293 (*human embryonic kidney cell*) a été décrite la première fois en 1977 suite à la transformation de ces cellules avec de l'ADN de l'adénovirus 5 (GRAHAM et al., 1977). Ces cellules sont utilisées pour l'étude de mécanismes moléculaires car elles permettent d'exprimer des vecteurs d'expression tels que pcDNA et pJ3M. Ces cellules sont gardées en culture dans du milieu DMEM supplémenté de FBS 5%, de pénicilline 100 UI/mL et de streptomycine 100 µg/mL. Les passages cellulaires sont réalisés avec une solution de PBS/EDTA [500 µM].

Des cellules HEK293 exprimant de façon stable le PAFR-HA (HEKPAFR) ont été produites dans des HEK293 par transfection au calcium-phosphate (4 mg ADN / pétri 100 mm) du vecteur pIRESP-HA-PAFR linéarisé par digestion avec l'enzyme de restriction PvuI (New England Biolabs Ltd.). Des clones indépendants ont été sélectionnés par résistance à l'antibiotique puromycine (3 µg/mL; InvivoGen, San Diego, USA) et caractérisés par cytométrie en flux avec l'anticorps spécifique 3F10 (anti-HA; Roche Diagnostics, Montréal, Canada).

Stimulation des cellules

De façon générale, pour des cellules adhérentes, il faut préparer du milieu de culture de cellules avec du HEPES (20 mM) et de la BSA (0,2%) et ajouter 90% du volume final désiré de ce milieu aux cellules. Le ligand est dilué dans le 10% de milieu restant, à une concentration 5 fois supérieure (PAF : $10 \times 10^{-7} \text{M}$) à celle désirée pour la stimulation

(PAF : 10^{-7} M). Après avoir ajouté le 80% du volume de stimulation, les cellules sont incubées pendant 30 minutes à 37°C pour s'acclimater. Le ligand 5 fois concentré est ajouté aux cellules pour obtenir la concentration finale désirée et pour le temps désiré à 37°C. Pour arrêter la stimulation, il faut placer les cellules sur la glace, aspirer le milieu de culture et ajouter du PBS (Annexe) à 4°C (1 mL/pétri de 100 mm ou 600 µL/1 puits de plaque à 6 puits). Les cellules sont récupérées avec un racleur de cellules, transférées dans un microtube, centrifugées et lysées dans du tampon de lyse.

6.2. MÉTHODES IMPLIQUANT DES PROTÉINES

Détection du PAFR avec les surnageants d'hybridome par cytométrie de flux

Les cellules à une confluence de 60-75% sont détachées au PBS, puis centrifugées à 1000 RPM pendant 10 minutes. Le culot est ensuite resuspendu dans du PBS contenant du BSA 2%. Il faut faire en sorte d'avoir une concentration de 10 millions de cellules /ml de PBS BSA 2%. Les cellules sont ensuite transférées en volume égal dans des tubes 1,5 ml pour avoir le nombre de conditions de traitement désiré, soit différentes concentrations ou différents temps de stimulations à essayer par exemple. Vu que la concentration mère des surnageants d'hybridome est utilisée dans ce cas-ci, les cellules sont encore une fois centrifugées pendant 10 minutes à 1000 RPM et 100 µl de surnageant d'hybridome est déposé sur le culot de cellules. Les cellules sont ensuite incubées pendant 45 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées avec 1 ml de PBS et centrifugées pendant une minute à 6000 RPM. Le PBS est ensuite aspiré et 50 µl de l'anticorps secondaire couplé au FITC est ajouté pendant 45 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées au PBS. Les échantillons sont analysés en cytométrie de flux avec une

fenêtre sur une population de cellules homogènes et analysés avec le programme CellQuest Pro (V.5.2.1).

Essai de BRET 2

Le BRET (bioluminescence resonance energy transfer) permet de détecter l'interaction entre deux protéines en temps réel dans des cellules vivantes. Une des protéines est fusionnée avec le donneur d'énergie lumineuse comme le *renilla luciférase* (Rluc) et l'autre protéine est fusionnée avec l'accepteur d'énergie, le GFP. Les deux protéines sont coexprimées dans la même cellule. Si les deux protéines interagissent ensemble, leur proximité permettra le transfert d'énergie entre la luciférase et le GFP. Il n'y a pas de transfert d'énergie si les deux protéines sont distancées de plus de 100 Å (HAMDAN et al., 2006).

Au jour 1, les cellules HEK 293 sont distribuées dans des plaques de six puits. Au jour 2, les cellules sont co-transfectées avec 1 µg total d'ADN, soit 0.5µg de PAFR-GFP et 0.5 µg de PAFR-Luc. Au jour 3, le milieu de culture est remplacé par du DMEM, et au jour 4, les cellules sont lavées deux fois au PBS, et 1 ml de PBS est ajouté dans chaque puits. Par la suite, les cellules sont incubées à 37°C pendant 3 minutes. Les cellules sont ensuite transférées dans des microtubes de 1.5 ml et centrifugées pendant 15 minutes à 3000 RPM. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 80 µl de PBS contenant du glucose (1 g/L), puis transférées dans une plaque de lecture pour le BRET de 96 puits. Les cellules sont ensuite stimulées pendant 5 minutes à 37 °C avec le PAF ou la molécule désirée pour avoir une concentration finale de 10^{-7} M pour le PAF et son véhicule l'éthanol et 10^{-5} M pour les modulateurs potentiellement allostériques et leur véhicule (acide acétique 0.1%).

La plaque est déposée sur glace pour arrêter la stimulation. Peu de temps avant de placer la plaque dans le lecteur de plaque (*Fusion universal microplate analyser*), le substrat de la luciférase, le Deepblue C coelenterazine est ajouté. La lecture s'effectue à une longueur d'onde de 410 nm. Le signal du BRET 2 est déterminé en calculant le ratio de la lumière émise par le GFP (green fluorescent protein) sur la lumière émise par le Rluc (renilla luciferase).

Électrophorèse SDS-PAGE et électrotransfert

Cette technique vise à séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Il faut d'abord faire polymériser un gel de résolution de bis-acrylamide (Annexe), à un pourcentage donnant une résolution optimale, dans un montage d'électrophorèse (Bio-Rad). Un gel de 10% pour ERK1/2 est recommandé. Par la suite, il faut faire polymériser sur le gel de résolution le gel de tassement de bis-acrylamide (Annexe) avec le nombre de puits nécessaires. Ce gel complet est installé dans un réservoir de migration (Bio-Rad) qui est rempli avec du tampon de migration (Annexe). Les échantillons sont déposés dans les puits et la migration est démarrée à 90 V pour passer le gel de concentration suivi de 120 V pour le gel de résolution. Lorsque le marqueur coloré indique que la migration des protéines est suffisante, le gel est récupéré et est ensuite déposé sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) déjà humidifiée avec le tampon de transfert (Annexe) et le montage est soumis au transfert (Bio-Rad). Le temps et le voltage varient selon la protéine à transférer : pour les protéines de moins de 50 kDa, il faut effectuer un transfert de 120 V durant 1,5 h.

Immunobuvardage de type Western

Afin d'éviter du marquage non spécifique, les membranes sont bloquées dans du tampon phosphate salin (PBS; Annexe) contenant du lait écrémé en poudre (5%). L'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt est ajouté dans le milieu de blocage. Les membranes sont incubées toute la nuit à 4°C avec une agitation légère. Les membranes sont rincées 3 fois avec du PBS pendant 10 minutes à la température de la pièce. L'anticorps secondaire couplé à la peroxidase de raifort (HRP) dirigé contre l'anticorps primaire est ajouté dans du PBS contenant du lait écrémé en poudre (5%) pour une durée de 60 minutes à la température de la pièce. Après l'incubation de l'anticorps secondaire, les membranes sont rincées 3 fois avec du PBS pendant 10 minutes à la température de la pièce. Les membranes sont ensuite déposées dans une cassette pour révélation de film, le substrat de la HRP (*Enhanced Chemiluminescence kit*) est déposé et la détection des protéines se fait par exposition d'un film de chemiluminescence, sensible à la lumière (Amersham). Le film peut ensuite être numérisé et les bandes réactives sont dosées avec un logiciel de quantification (*NIH Image Scan Analysis software, V.1.7*).

6.3 ESSAIS FONCTIONNELS

Dosage des inositols phosphates

Cette technique a été décrite dans la littérature (THIVIERGE et al., 1996). Brièvement, les cellules sontensemencées dans des plaques à 6 puits (5×10^5 /puits) et, quarante-huit heures après le passage cellulaire, (elles doivent être confluentes à 100 %), les cellules sont rincées avec du PBS stérile et du milieu DMEM sans inositol additionné

de myo-[^3H]-inositol (3 $\mu\text{Ci/ml}$) est ajouté aux puits pour 24 heures supplémentaires. Le milieu est remplacé par du milieu sans inositol contenant de la BSA (0,1%) et du LiCl (20 mM) et incubées 10 minutes à 37°C. Le PAF 10^{-7}M ou son véhicule, les molécules orthostériques ou celles potentiellement allostériques sont ensuite ajoutées pendant le temps désiré à 37°C. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'acide perchlorique froid 0.4 M à chaque puits. Les lysats sont transférés dans des microtubes de 1,5 mL et du 0.72 N KOH / 0.6M KHCO_3 est ajouté. Les microtubes sont ensuite centrifugés pendant cinq minutes à 13000 RPM. Le surnageant est transférée sur une colonne de résine Dowex AG1-X8. Après que les échantillons aient passé dans la résine, un rinçage est effectué avec une solution d'acide formique 0.1N (Annexe). Les colonnes sont transférées dans des tubes à scintillation et 3 mL d'une solution d'ammonium formate (1,5 M; Annexe) sont ajoutés aux tubes de même que du liquide à scintillation pour compter la radioactivité dans un compteur β . Les données sont exprimées sous forme de CPM (comptes par millions).

6.4 ANALYSES STATISTIQUES

Pour l'analyse statistique, le test T de Student a été effectué en utilisant le programme SigmaStat 3.0 software (SPSS Inc. Chicago, USA). Les différences sont considérées significatives lorsque $P \leq 0.05$ pour $n \geq 3$.

Partie 7 : Résultats

7.1 Molécules orthostériques

1A- Production d'inositols phosphates dans les HEK 293 PAFR-HA en présence de molécules synthétiques.

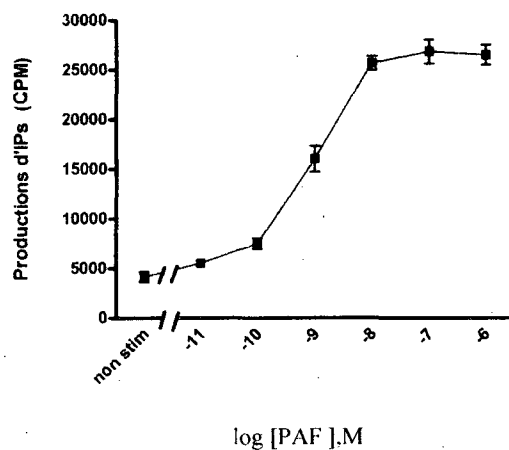
Courbe de concentration-réponse et de cinétique de la stimulation au PAF dans les HEK 293 PAFR HA

Dans nos études sur l'activation du PAFR par des molécules orthostériques, des essais similaires de production d'inositols phosphates ont été réalisés avec les molécules orthostériques et les modulateurs potentiellement allostériques. En ce qui a trait aux essais d'extraction d'inositols phosphates, leur production dépendante de la concentration de l'agoniste naturel, le PAF, a été d'abord déterminée (Fig 1 A) dans les cellules HEK 293 transfectées de façon stable avec le récepteur du PAF. Ceci, afin de déterminer la concentration optimale de PAF pour induire une production maximale d'inositols phosphates dans ces cellules. À 10^{-11} M et 10^{-10} M, l'augmentation dans la production d'inositols induite par le PAF en comparaison avec les cellules stimulées avec le véhicule était non significative. Une augmentation considérable, soit de trois fois celle obtenue avec le véhicule, est obtenue avec une stimulation au PAF à 10^{-9} M. Par contre cette augmentation de la production d'inositols était nettement significative quand les cellules étaient stimulées avec le PAF de 10^{-8} M à 10^{-6} M, soit supérieure de cinq à six fois à la production obtenue quand les cellules étaient stimulées avec le véhicule éthanol. Une cinétique de la production d'inositols phosphates a également été déterminée afin de voir quel était le meilleur temps de stimulation pour induire une production maximale d'inositols phosphates (Fig 1B). D'après les résultats obtenus, une stimulation de cinq minutes serait le temps optimal pour l'extraction d'inositols phosphates. Après 20

minutes de stimulation, la production d'inositols était diminuée de façon importante. Tout au long des essais sur la production d'inositols phosphates, la stimulation des cellules a été réalisée avec le PAF à une concentration de 10^{-7} M pendant cinq minutes.

Concentration Réponse de la production d'IPs en fonction du PAF dans les cellules HEK 293 PAFR -HA

A



B

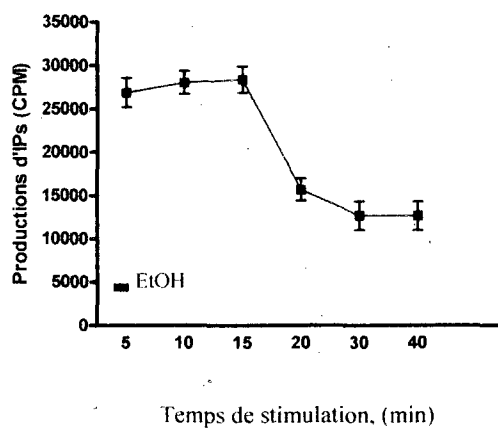


Fig. 1.A. Concentration-Réponse de Production d'inositol phosphate dans les cellules HEK 293 PAFR-HA. La production d'inositol phosphate a été mesurée après la stimulation des cellules avec différentes concentrations du PAF (10^{-11} à 10^{-6} M) pendant 5 minutes. Le premier point non stim représente le contrôle étant le traitement à l'éthanol. **B.** Cinétique de la production d'inositol phosphates. La production d'IP est mesurée après la stimulation au PAF 10^{-7} M différents temps. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de trois expériences indépendantes.

Efficacité des antagonistes du PAF

Les HEK 293 exprimant de façon stable le récepteur du PAF ont été utilisées pour confirmer l'activité antagoniste et agoniste inverse des différentes molécules orthostériques. Quoique ces composés soient tous des ligands du PAFR, parce qu'ils interfèrent avec la liaison du [^3H]WEB2086 ou du [^3H]PAF (DUPRÉ et al., 2001), plusieurs d'entre eux ne compétitionnent pas de façon efficace avec le PAFR pour la production d'inositols phosphates dans les cellules HEK 293. Pour les essais d'antagonistes, deux types d'expériences ont été réalisées. Premièrement, la production d'inositols a été mesurée soit en faisant varier les concentrations de PAF (10^{-11}M à 10^{-6}M) et en gardant la concentration des molécules orthostériques constante (10^{-5}M) (Fig 2,3,4,5,6,7,8 B), soit deuxièmement en gardant constante la concentration de PAF à 10^{-8}M , et en faisant varier la concentration des molécules orthostériques de 10^{-8}M à 10^{-4}M (Fig 2,3,4,5,6,7,8 C). Pour la première série d'expériences, en présence de bromure d'octylonium (10^{-5}M) et de PAF (10^{-10} , 10^{-9} et 10^{-8}M), de PCA 4248 (10^{-5}M) et de PAF (10^{-9} , 10^{-10} et 10^{-7}M), de FR49175 (10^{-5}M) et de PAF 10^{-6}M et de Trans BTP dioxolane (10^{-5}M) et de PAF 10^{-9} , 10^{-8} et 10^{-6}M , et finalement de WEB 1086 (10^{-5}M) et de PAF 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} et 10^{-7}M , la production d'inositols phosphates a été significativement diminuée. Pour les autres concentrations utilisées pour les molécules orthostériques et le PAF, la diminution de la production d'inositols phosphates n'était pas significative. Pour la deuxième série d'expériences, à part le FR49175, pour toutes les autres molécules orthostériques, la diminution de la production d'inositols était significative quand les cellules étaient en présence de PAF 10^{-8}M et de 10^{-5} et 10^{-4}M pour les molécules.

Efficacité des agonistes inverses

La plupart des antagonistes se comportent également comme des agonistes inverses (MAY et al., 2007), c'est à dire qu'ils contribuent à diminuer l'activité basale dans la cellule. Afin de déterminer si ces molécules orthostériques se comportaient également comme des agonistes inverses, la production d'inositols phosphates a été mesurée suite à la mise en présence des cellules avec les molécules seules. En effet, toutes ces molécules diminuaient la production basale d'inositols quand elles étaient utilisées à différentes concentrations soit de 10^{-5} M à 10^{-8} M (Fig 2, 3, 4, 6, 7 et 8 A). Suite aux essais de comparaison en ce qui a trait à l'activité agoniste inverse des différentes molécules orthostériques, le WEB 2086, puis le bromure d'octylonium se sont révélés être les meilleurs agonistes inverses pour la production d'inositols phosphates dans les cellules HEK 293 PAFR-HA.

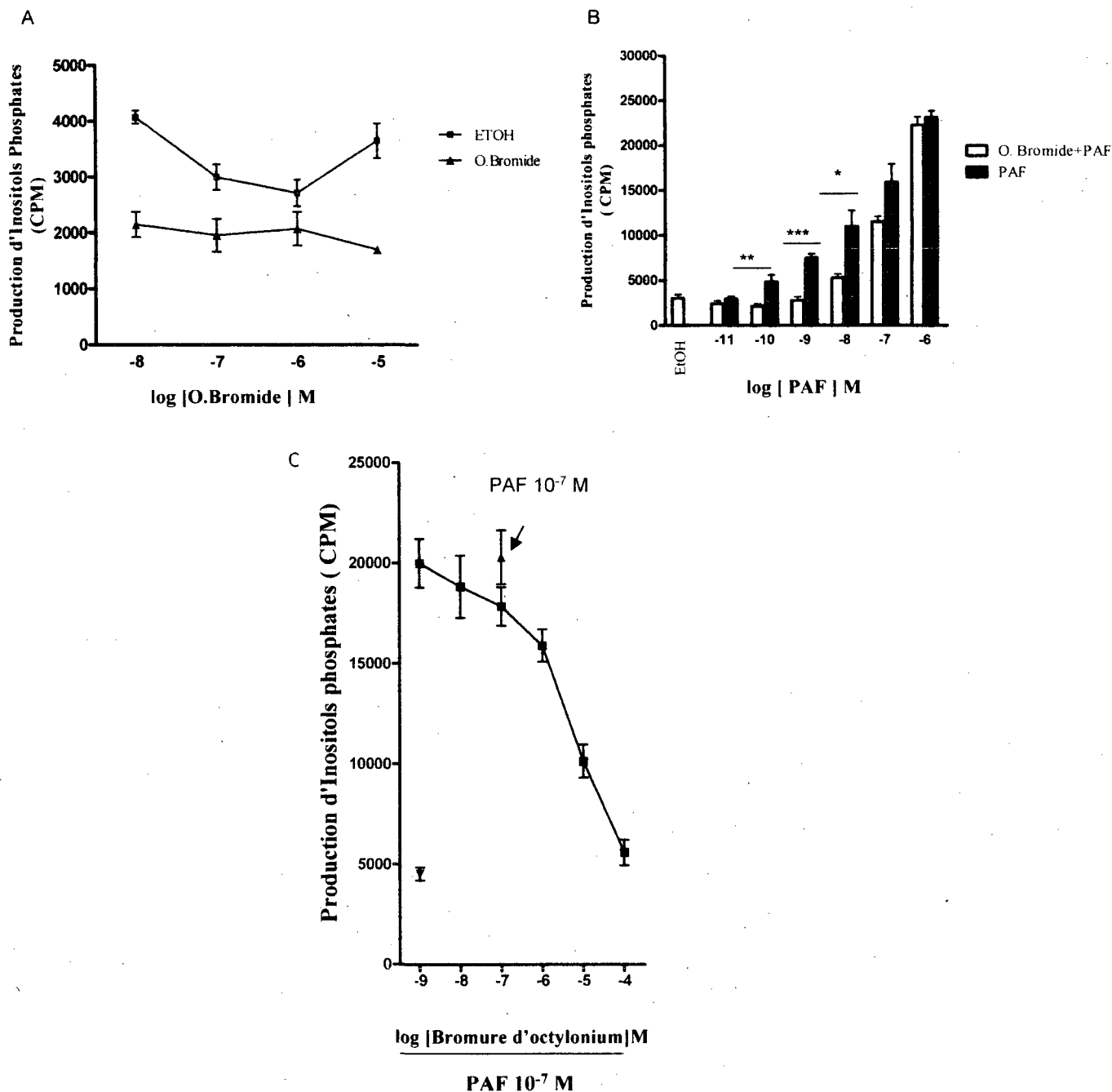


Fig 2: A: Activité agoniste inverse du bromure d'octylonium. La production d'inositols phosphates a été mesurée après le traitement des cellules HEK293 PAFR-HA avec différentes concentrations de bromure d'octylonium soit de 10^{-5} M à 10^{-8} M pendant 5 minutes. Les cellules ont également été exposées au véhicule comme contrôle. B: Effet du bromure d'octylonium sur la production d'inositols phosphates induite par différentes concentrations du PAF dans les cellules HEK 293 exprimant le PAFR-HA. La production d'inositols phosphates a été mesurée après le prétraitement des cellules avec une concentration constante de bromure d'octylonium soit 10^{-5} M pendant 30 minutes, suivie de la stimulation avec différentes concentrations du PAF (10^{-11} M à 10^{-6} M) pendant 5 minutes. Les colonnes pleines représentent les cellules stimulées uniquement avec le PAF. C: Effet de différentes concentrations de bromure d'octylonium sur la production d'inositols phosphates dans les HEK 293 PAFR-HA stimulées au PAF 10^{-7} M. La production d'inositols phosphates a été mesurée après le traitement des cellules avec différentes concentrations de bromure d'octylonium soit de 10^{-9} M à 10^{-5} M pendant 30 minutes, suivie de la stimulation avec le PAF à une concentration constante soit de 10^{-7} M. Comme contrôles, des cellules ont été stimulées soit avec le PAF tout seul, soit avec le véhicule tout seul. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. B: *, $P = 0.0105$, ** $P = 0.0076$, *** $P < 0.0001$ (Bromure d'octylonium + PAF par rapport au PAF seul). IC₅₀ du Bromure d'octylonium: 4.78×10^{-6} M

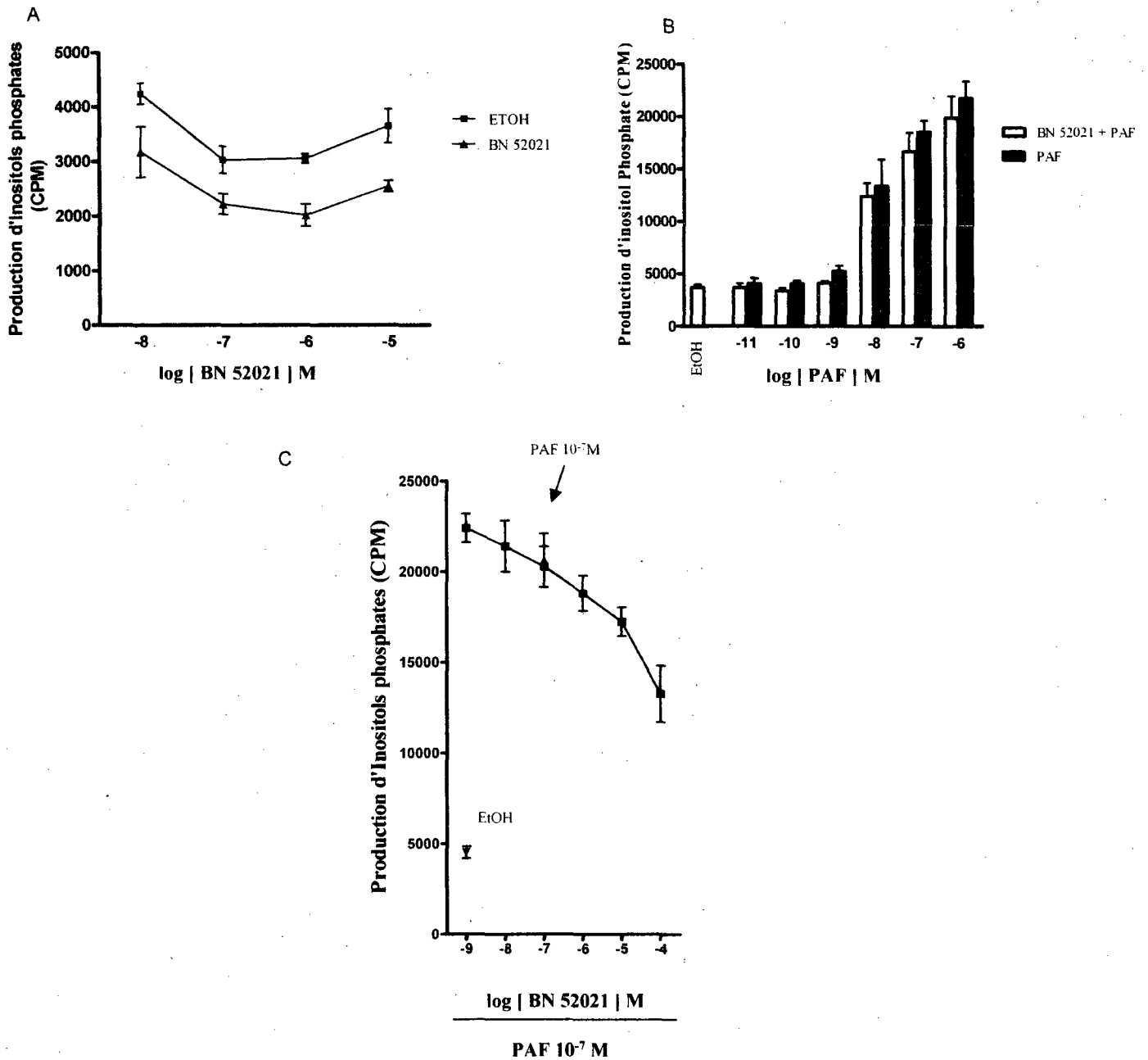


Fig 3: A: Activité agoniste inverse de BN52021. La production d'inositol phosphates a été mesurée après le traitement des cellules HEK 293 PAFR-HA avec différentes concentrations de BN52021 soit de 10^{-5} M à 10^{-8} M pendant 5 minutes. Les cellules ont également été exposées au véhicule comme contrôle. B: Effet de BN52021 sur la production d'inositol phosphates induite par différentes concentrations du PAF dans les cellules HEK 293 PAFR-HA. La production d'inositol phosphates a été mesurée après le prétraitement des cellules avec une concentration constante de BN52021 soit 10^{-5} M pendant 30 minutes, suivie de la stimulation avec différentes concentrations du PAF (10^{-11} M à 10^{-6} M) pendant 5 minutes. Les différentes concentrations utilisées pour le PAF varient de 10^{-11} M à 10^{-6} M. Les colonnes pleines présentent les cellules stimulées uniquement avec le PAF. C: Effet de différentes concentrations de BN52021 sur la production d'inositol phosphate dans les cellules HEK 293 PAFR-HA stimulées avec le PAF 10^{-7} M. La production d'inositol phosphates a été mesurée après le traitement des cellules avec différentes concentrations de BN52021 soit de 10^{-9} M à 10^{-5} M pendant 30 minutes, suivie de la stimulation avec le PAF à une concentration constante soit de 10^{-7} M. Comme contrôles, des cellules ont été stimulées soit avec le PAF tout seul, soit avec le véhicule tout seul. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. IC-50 du BN52021: 7.65×10^{-6} M

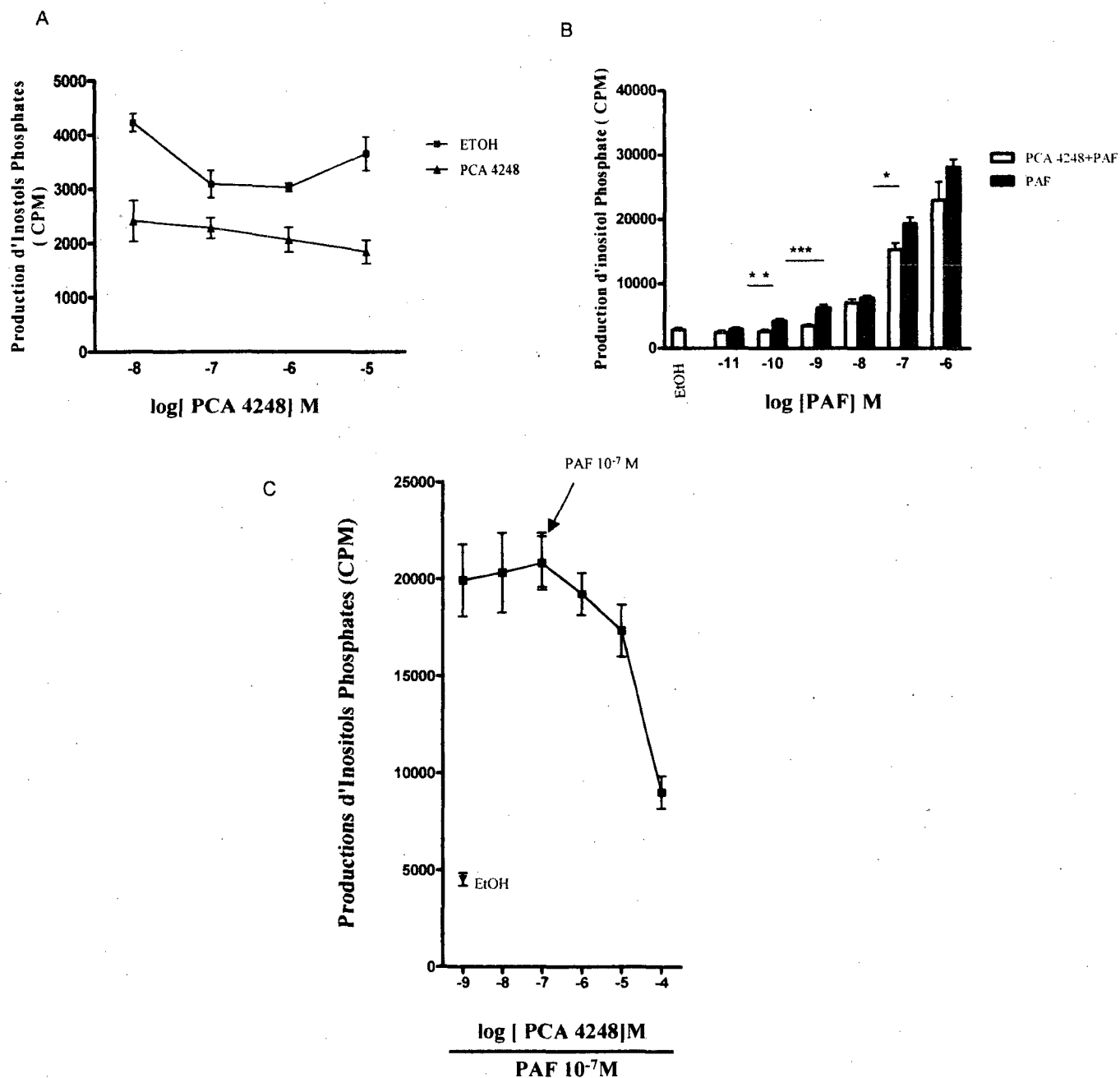


Fig 4: Activité agoniste inverse de PCA 4248. La production d'inositol phosphate a été mesurée après le traitement des cellules HEK 293 PAFR-HA avec différentes concentrations de PCA 4248 soit de 10^{-5} M à 10^{-8} M pendant 5 minutes. Des cellules ont également été exposées au véhicule comme contrôle. B: Effet de PCA 4248 sur la production d'inositol phosphates induite par différentes concentrations du PAF dans les cellules HEK 293 PAFR-HA. La production d'inositol phosphates a été mesurée après le prétraitement des cellules avec une concentration constante de PCA 4248 soit 10^{-5} M pendant 30 minutes, suivie de la stimulation avec différentes concentrations du PAF (10^{-11} M à 10^{-6} M pendant 5 minutes. Les différentes concentrations utilisées pour le PAF varient de 10^{-11} M à 10^{-6} M. Les colonnes pleines représentent les cellules stimulées uniquement avec le PAF. C: Effet de différentes concentrations de PCA 4248 sur la production d'inositol phosphates dans les cellules HEK 293 PAFR-HA stimulées au PAF 10^{-7} M. La production d'inositol phosphates a été mesurée après le traitement des cellules avec différentes concentrations de PCA 4248 soit de 10^{-9} M à 10^{-4} M pendant 30 minutes, suivie de la stimulation avec le PAF à une concentration constante soit de 10^{-7} M. À titre de comparaison, des cellules ont été stimulées soit avec le PAF tout seul, soit avec le véhicule tout seul. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de trois expériences indépendantes. B: *, $P = 0.0210$, **, $P = 0.0042$, ***, $P = 0.0005$ (PCA4248 + PAF par rapport au PAF seul). IC-50 de PCA4248: 4.54×10^{-5} M

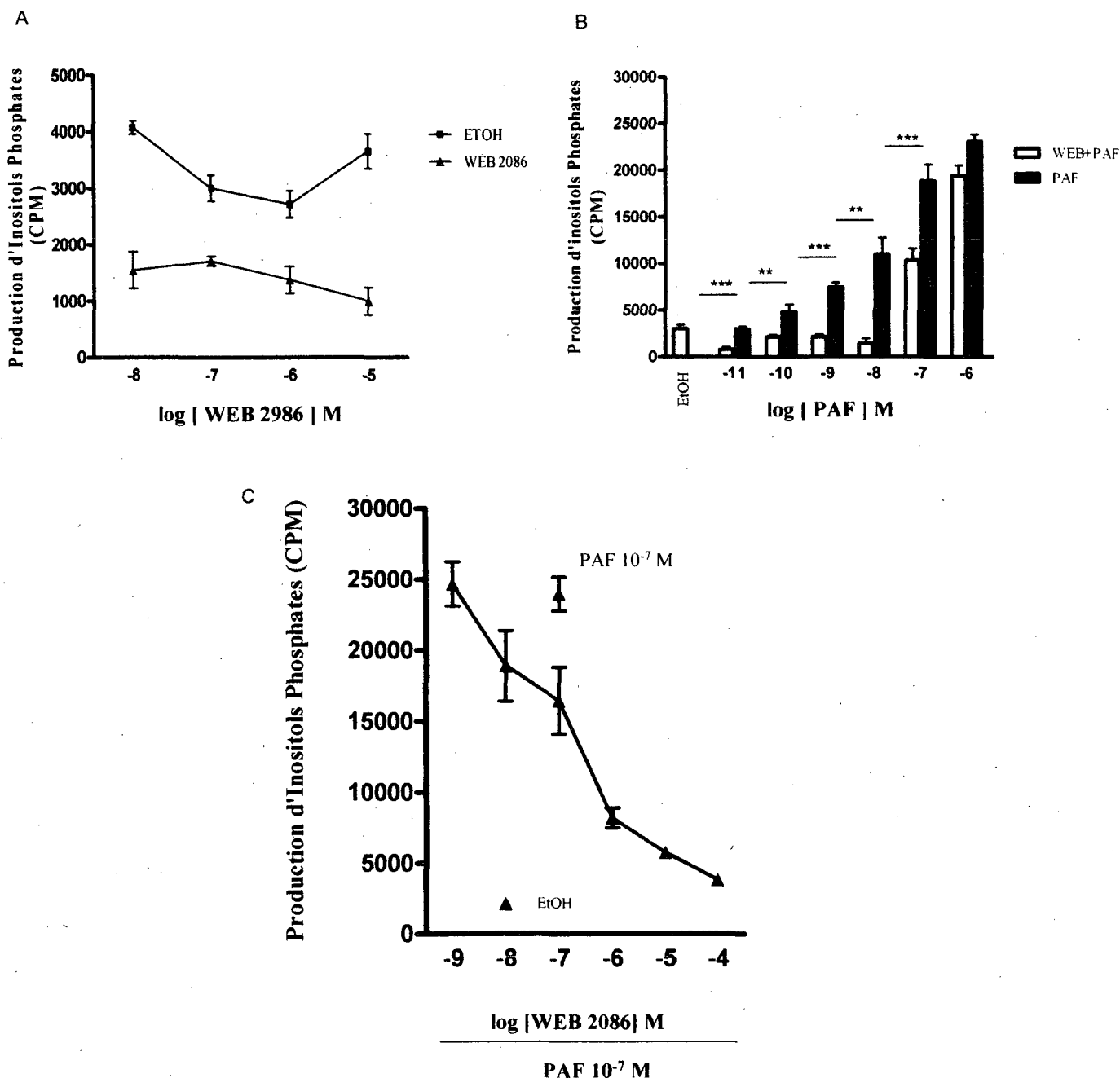


Fig 5: Activité agoniste inverse de WEB 2086. La production d'inositols phosphate a été mesurée après le traitement des cellules HEK 293 PAFR-HA avec différentes concentrations de WEB 2086 soit de 10^{-5} M à 10^{-8} M pendant 5 minutes. Des cellules ont également été exposées au véhicule comme contrôle. B: Effet de WEB 2086 sur la production d'inositols phosphates induite par différentes concentrations du PAF dans les cellules HEK 293PAFR-HA. La production d'inositols phosphates a été mesurée après le prétraitement des cellules avec une concentration constante de WEB2086 soit 10^{-5} M pendant 30 minutes, suivie de la stimulation avec différentes concentrations du PAF (10^{-11} M à 10^{-6} M) pendant 5 minutes. Les différentes concentrations utilisées pour le PAF varient de 10^{-11} M à 10^{-6} M. Les colonnes pleines représentent les cellules stimulées uniquement avec le PAF. C: Effet de différentes concentrations de CV3988 sur la production d'inositols phosphates dans les cellules HEK 293 PAFR-HA stimulées avec le PAF 10^{-7} M. La production d'inositols phosphates a été mesurée après le traitement des cellules avec différentes concentrations de CV3988 soit de 10^{-9} M à 10^{-4} M pendant 30 minutes, suivie de la stimulation avec le PAF à une concentration constante soit de 10^{-7} M. Comme contrôles, des cellules ont été stimulées soit avec le PAF tout seul, soit avec le véhicule tout seul. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de trois expériences indépendantes. B: ***, $P = 0.0004$, **, $P = 0.0028$ (CV3988 + PAF par rapport au PAF seul). IC-50 de WEB2086: $1.88 \cdot 10^{-7}$ M

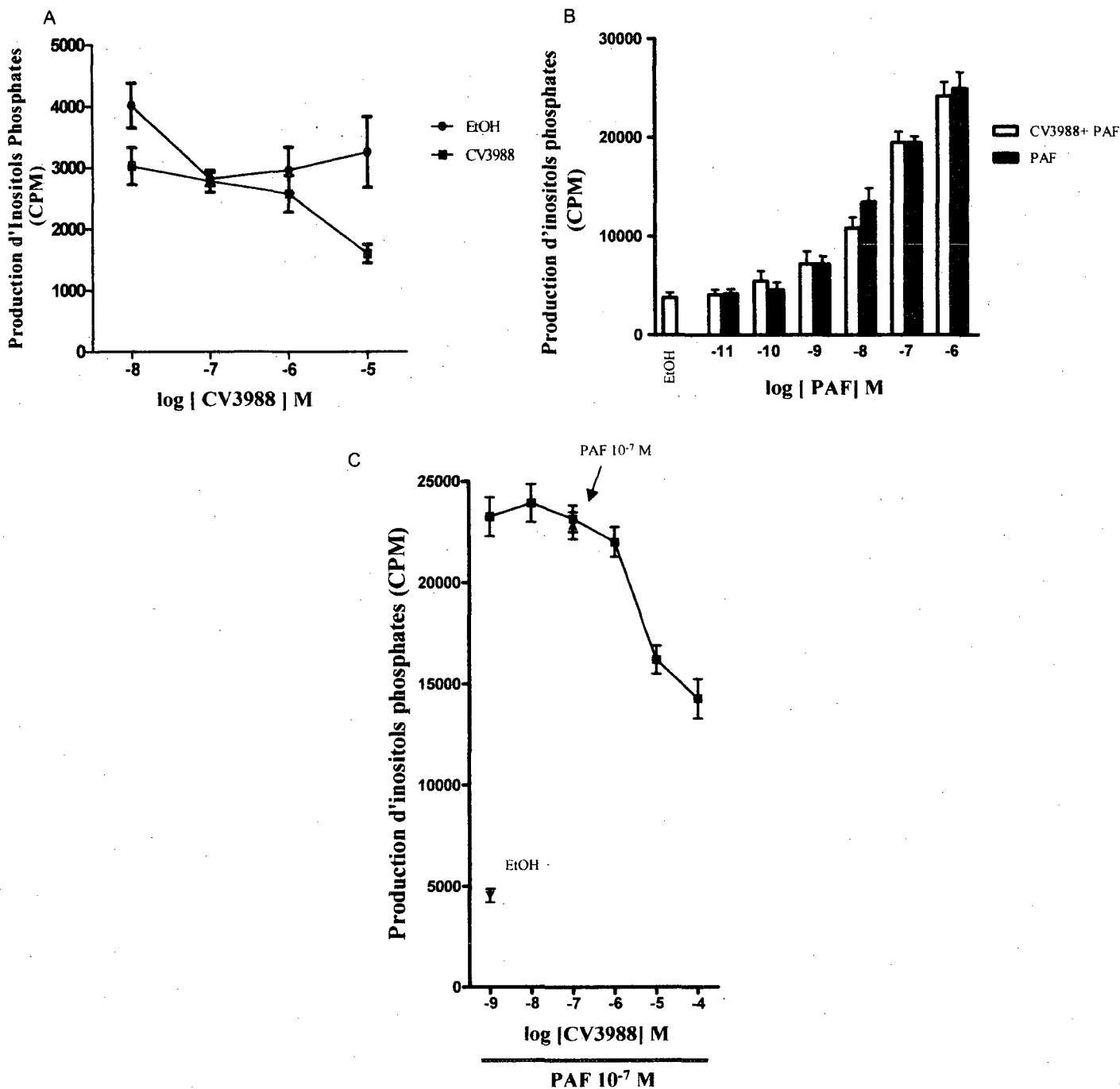


Fig 6: Activité agoniste inverse de CV3988. La production d'inositols phosphates a été mesurée après le traitement des cellules HEK 293 PAFR-HA avec différentes concentrations de CV3988 soit de 10^{-5} M à 10^{-8} M pendant 5 minutes. Des cellules ont également été exposées au véhicule comme contrôle. B: Effet de CV3988 sur la production d'inositols phosphates induite par différentes concentrations du PAF dans les cellules HEK 293 PAFR-HA. La production d'inositols phosphates a été mesurée après le prétraitement des cellules avec une concentration constante de CV3988 soit 10^{-5} M pendant 30 minutes, suivie de la stimulation avec différentes concentrations du PAF (10^{-11} M à 10^{-6} M) pendant 5 minutes. Les différentes concentrations utilisées pour le PAF varient de 10^{-11} M à 10^{-6} M. Les colonnes pleines représentent les cellules stimulées uniquement avec le PAF. C: Effet de différentes concentrations de CV3988 sur la production d'inositols phosphates dans les cellules HEK 293 PAFR-HA stimulées avec le PAF 10^{-7} M. La production d'inositols phosphate a été mesurée après le traitement des cellules avec différentes concentrations de CV3988 soit de 10^{-9} M à 10^{-4} M pendant 30 minutes, suivie de la stimulation avec le PAF à une concentration constante soit de 10^{-7} M. Comme contrôles, des cellules ont été stimulées soit avec le PAF tout seul, soit avec le véhicule tout seul. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de trois expériences indépendantes. IC-50 de CV3988: 4.06×10^{-6} M

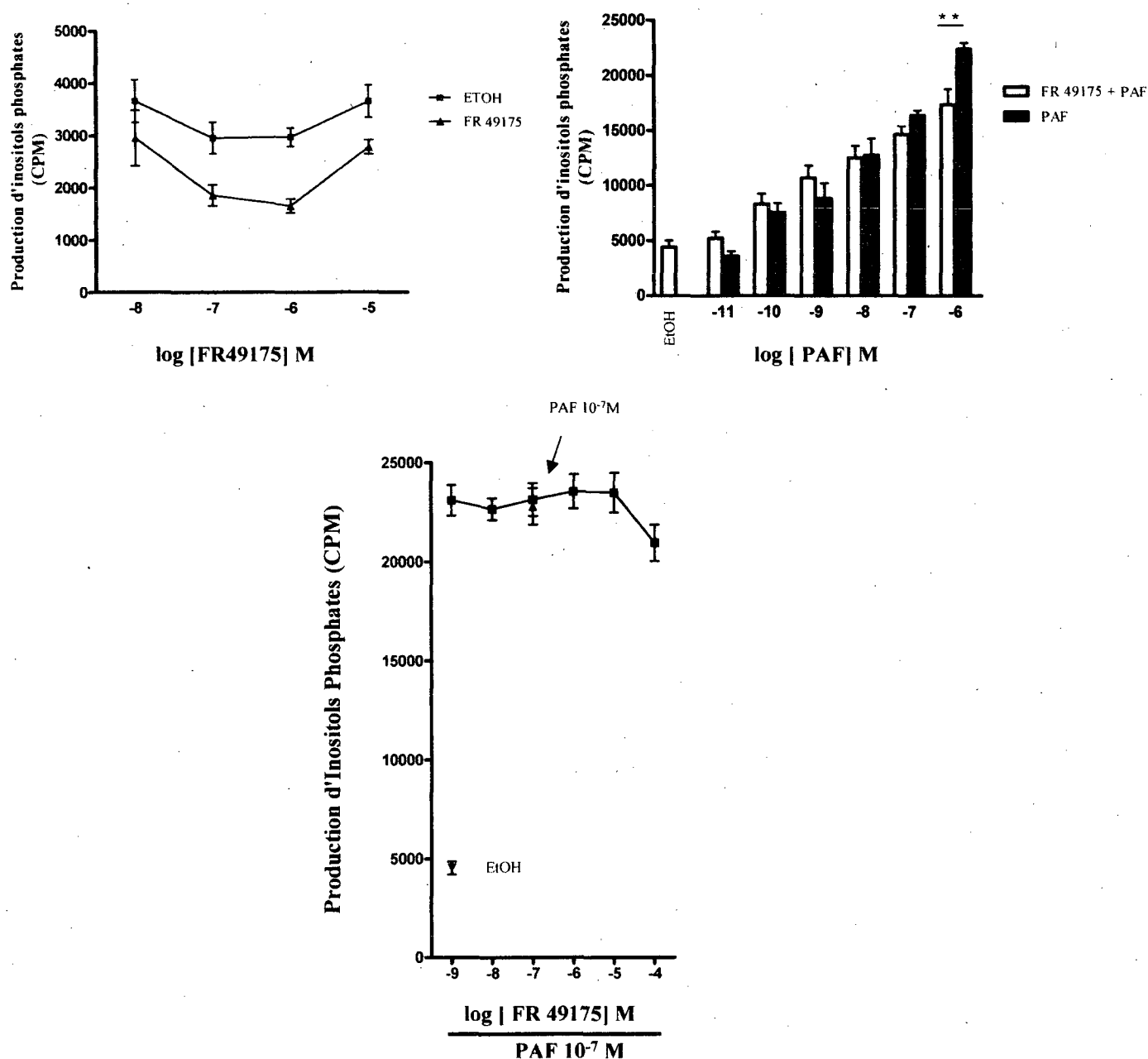


Fig 7: A: Activité agoniste inverse de FR49175. La production d'inositol phosphates a été mesurée après le traitement des cellules HEK 293 PAFR-HA avec différentes concentrations de FR49175 soit de 10^{-5} M à 10^{-8} M pendant 5 minutes. Des cellules ont également été exposées au véhicule comme contrôle. B: Effet de FR49175 sur la production d'inositol phosphates induite par différentes concentrations du PAF dans les cellules HEK 293 PAFR-HA. La production d'inositol phosphates a été mesurée après le prétraitement des cellules avec une concentration constante de FR 49175 soit 10^{-5} M pendant 30 minutes, suivie de la stimulation avec différentes concentrations du PAF (10^{-11} M à 10^{-6} M) pendant 5 minutes. Les différentes concentrations utilisées pour le PAF varient de 10^{-11} M à 10^{-6} M. Les colonnes pleines représentent les cellules stimulées uniquement avec le PAF. C: Effet de différentes concentrations de FR49175 sur la production d'inositol phosphates dans les cellules HEK 293 PAFR-HA stimulées avec le PAF 10^{-7} M. La production d'inositol phosphates a été mesurée après le traitement des cellules avec différentes concentrations de FR49175 soit de 10^{-9} M à 10^{-4} M pendant 30 minutes, suivie de la stimulation avec le PAF à une concentration constante soit de 10^{-7} M. Comme contrôles, des cellules ont été stimulées soit avec le PAF tout seul, soit avec le véhicule tout seul. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. B: **, $P = 0.0070$ (FR49175 + PAF par rapport au PAF seul)

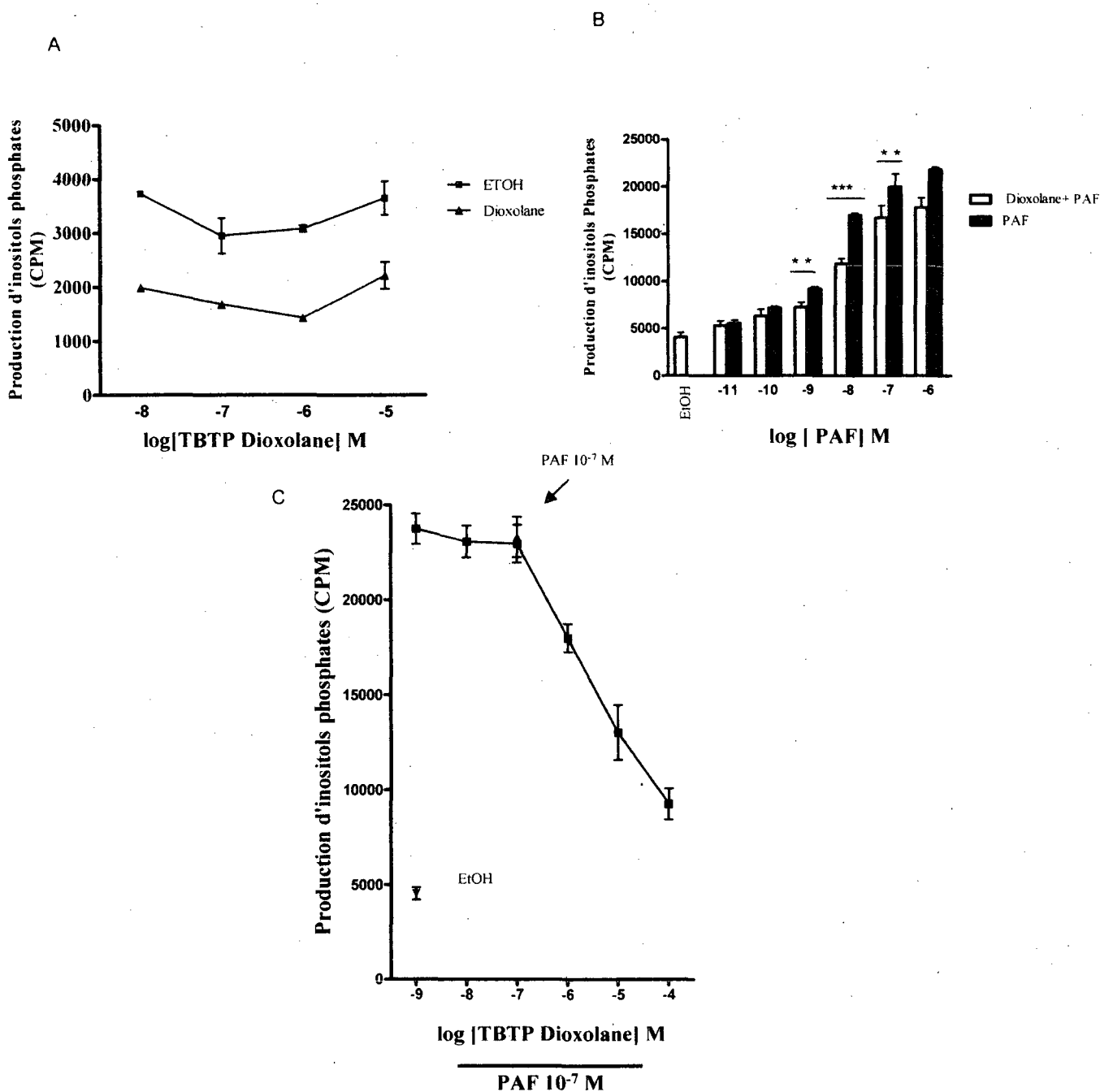


Fig 8: A: Activité agoniste inverse de Trans BTP dioxolane. La production d'inositols phosphates a été mesurée après le traitement des cellules HEK 293 PAFR-HA avec différentes concentrations de TBTP dioxolane soit de 10^{-5} M à 10^{-8} M pendant 5 minutes. Des cellules ont également été stimulées avec le véhicule comme contrôle. B: Effet de TBTP dioxolane sur la production d'inositols phosphates induite par différentes concentrations du PAF dans les cellules HEK 293 PAFR-HA. La production d'inositols phosphates a été mesurée après le prétraitement des cellules avec une concentration constante de TBTP dioxolane soit 10^{-5} M pendant 30 minutes, suivie de la stimulation avec différentes concentrations du PAF (10^{-11} M à 10^{-6} M) pendant 5 minutes. Les différentes concentrations utilisées pour le PAF varient de 10^{-11} M à 10^{-6} M. Les colonnes pleines représentent les cellules stimulées uniquement avec le PAF. C: Effet de différentes concentrations de TBTP dioxolane sur la production d'inositols phosphates dans les cellules HEK 293 PAFR-HA stimulées au PAF 10^{-7} M. La production d'inositols phosphates a été mesurée après le traitement des cellules avec différentes concentrations de FR49175 soit de 10^{-9} M à 10^{-4} M pendant 30 minutes, suivie de la stimulation au PAF à une concentration constante soit de 10^{-7} M. Comme contrôles, des cellules ont été stimulées soit avec le PAF tout seul, soit avec le véhicule tout seul. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. B: **, P = 0.0037, ***, P < 0.0001. (TBTP Dioxolane + PAF par rapport au PAF seul)
IC-50 de TBTP Dioxolane: 1.625×10^{-6} M

Activation de ERK 1/2 dans les cellules HEK 293 PAFR-HA

L'activation de la voie MAPK a également été vérifiée en déterminant si les protéines kinases ERK1/2 étaient phosphorylées suite à la stimulation des cellules par le PAF. Tout d'abord, afin de déterminer la concentration optimale de PAF pour induire une phosphorylation de ERK 1/2, des essais de MAPK dépendant de la concentration du PAF soit de 10^{-11} à 10^{-7} M ont été réalisés. Le véhicule, soit l'éthanol a également été utilisé afin de voir s'il induisait également une réponse (Fig 9). Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que les concentrations de 10^{-9} , 10^{-8} et 10^{-7} M de PAF induisaient une phosphorylation significative des kinases ERK1/2.

Phosphorylation de Erk1/2 en fonction de la concentration de PAF dans les cellules HEK 293 PAFR-HA

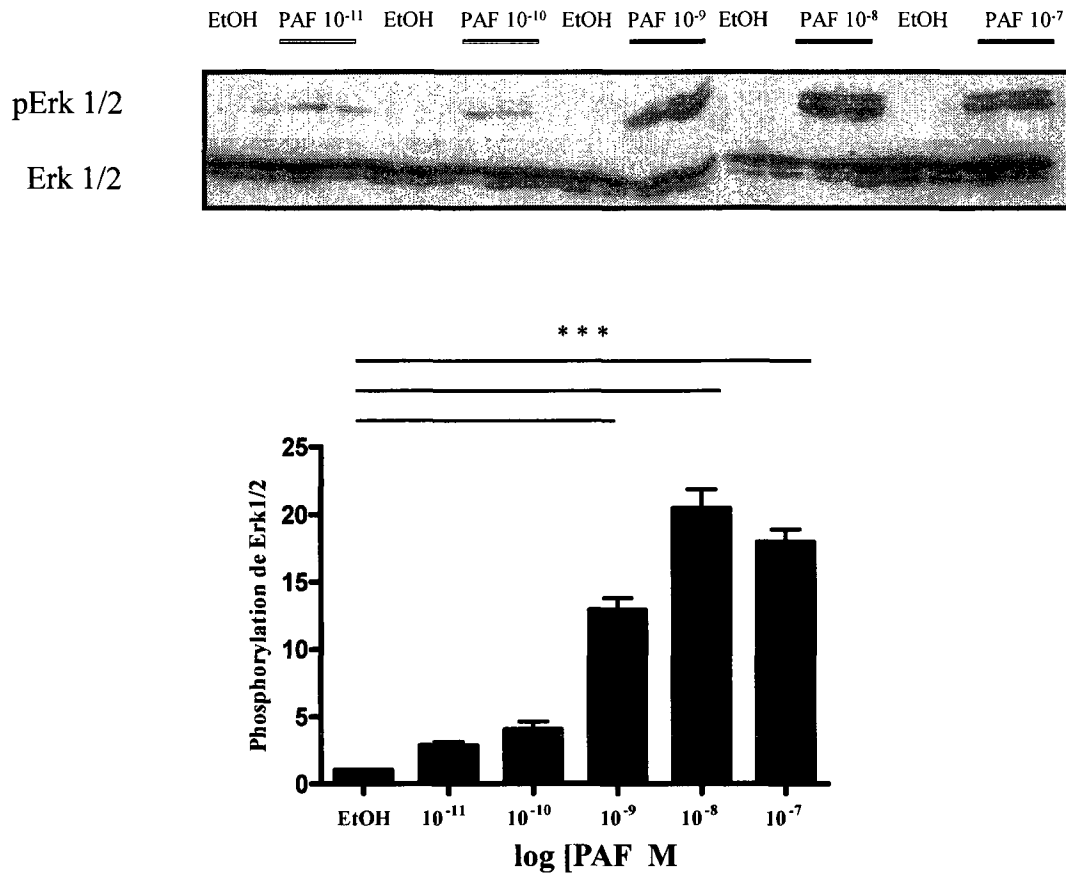


Fig 9: Phosphorylation de Erk 1/2 dans les cellules HEK 293 PAFR-HA en fonction de la concentration de PAF (10⁻¹¹ à 10⁻⁷ M). Les cellules ont été stimulées avec différentes concentrations du PAF pendant 5 minutes. Les membranes ont été mis en présence de l'anticorps anti pErk 1/2, puis lavées, débarrassées de l'anticorps, et remises en présence de l'anticorps anti-Erk 1/2. Les figures représentent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. ***; P < 0.0001 (par rapport à l'éthanol). Les graphiques ont été réalisés suite à l'analyse par densité optique. Pour chaque point, le ratio pErk 1/2 / Erk1/2 est normalisé par rapport à l'éthanol.

Cinétique de la phosphorylation de ERK 1/2

Une fois que la concentration optimale de PAF à stimuler la phosphorylation de ERK 1/2 ait été déterminée, une cinétique permettant de déterminer le meilleur temps de stimulation pour avoir une phosphorylation maximale a été réalisée. Les résultats obtenus montrent que la phosphorylation de ERK 1/2 est biphasique (Fig 10). Au cours de la première phase de stimulation, deux à cinq minutes sont suffisantes pour détecter une phosphorylation significative de ERK 1/2 et au cours de la deuxième phase, une phosphorylation significative de ERK 1/2 est obtenue après cinquante minutes de stimulation avec le PAF de 10^{-7} M.

Cinétique de la phosphorylation de Erk 1/2 dans les cellules HEK 293-PAFR-HA

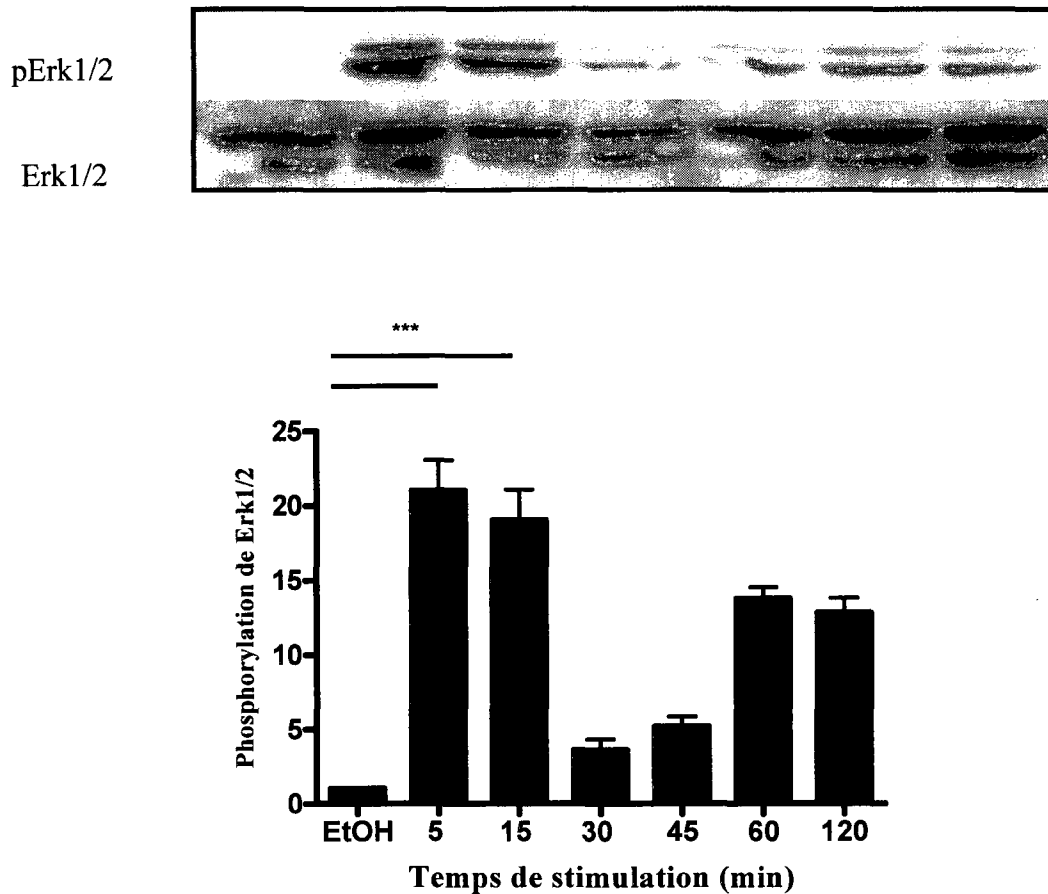


Fig 10: Cinétique de la phosphorylation de ERK1/2 induite par le PAF (10^{-8} M) à différents temps de stimulation dans les cellules HEK 293 PAFR-HA. Les membranes ont été mis en présence de l'anticorps anti pErk 1/2, puis, lavées, débarrassées de l'anticorps puis remises en présence de l'anticorps anti-Erk 1/2. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Les graphiques ont été réalisés suite à l'analyse par densité optique. *** P = 0.0005 (par rapport à l'éthanol). Pour chaque point, le ratio pErk 1/2 / Erk1/2 est normalisé par rapport à l'éthanol.

Essais d'antagonistes et d'agonistes inverse sur la phosphorylation de ERK 1/2 en fonction de la concentration des molécules orthostériques et du PAF

Afin d'évaluer l'efficacité des molécules orthostériques à inhiber la réponse induite par le PAF sur la phosphorylation de ERK1/2, les cellules ont d'abord été traitées pendant 30 minutes avec les molécules, Trans BTP dioxolane, CV3988, BN 52021, bromure d' octylonium, PCA 4248 et le WEB2086 à deux concentrations différentes, soit 10^{-5} et 10^{-7} M, puis stimulées au PAF soit à 10^{-8} , 10^{-9} et 10^{-10} M, pendant 5 minutes. Il s'est avéré que lorsque la concentration de la molécule orthostérique était 1000 ou 10000 fois supérieure (dépendamment de la molécule) à celle du PAF : soit 10^{-5} M pour les molécules et 10^{-8} ou 10^{-9} M pour le PAF, l'inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 était significative (Figs 11, 12, 13, 14, 15, 16). Aucune des molécules lorsqu'elles étaient utilisées seules n'induisaient la phosphorylation de ERK 1/2. On peut donc conclure que la capacité des molécules orthostériques à inhiber la phosphorylation de ERK1/2 induite par le PAF dépend de la concentration du PAF et de la molécule utilisée. Par contre, deux hypothèses peuvent être émises d'après les résultats obtenus quand les cellules étaient seulement traitées avec les molécules : soit ces molécules sont toutes des agonistes inverses puisqu'elles induisent très peu ou pas du tout la phosphorylation de ERK1/2, soit que ces molécules utilisées seules avaient un effet neutre sur l'état d'activation du récepteur.

Phosphorylation de Erk1/2 dans les cellules HEK-293 PAFR-HA en présence de PAF et de bromure d'octylonium

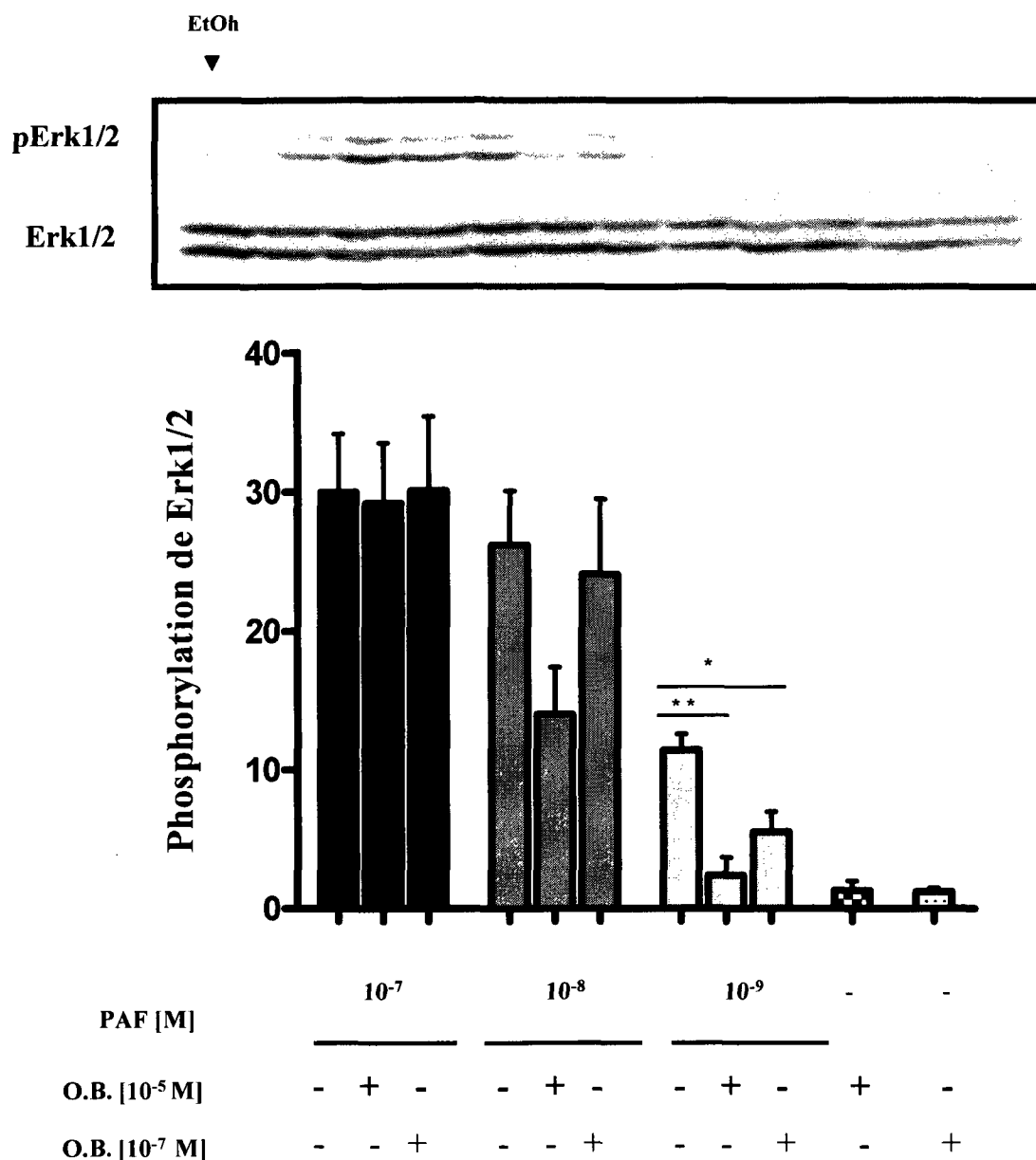


Fig 11: Efficacité du Bromure d'octylonium (10⁻⁵ et 10⁻⁷ M) à inhiber la phosphorylation de Erk 1/2 induite par le PAF (10⁻⁷, 10⁻⁸ et 10⁻⁹ M) dans les cellules HEK 293 PAFR-HA. Les cellules ont d'abord été traitées pendant 30 minutes avec l'octylonium bromide, puis stimulées par le PAF pendant 5 minutes. Les membranes ont été mis en présence de l'anticorps anti pErk 1/2, puis lavées, débarrassées de l'anticorps, puis remises en présence de l'anticorps anti-Erk 1/2. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Les graphiques ont été réalisés suite à l'analyse par densité optique. *, P = 0.0334, **, P = 0.0062 (par rapport au PAF 10⁻⁹ M). Pour chaque point, le ratio pErk 1/2 / Erk1/2 est normalisé par rapport à l'éthanol.

Phosphorylation de Erk1/2 dans les cellules HEK-293 PAFR-HA en présence de PAF et de CV 3988

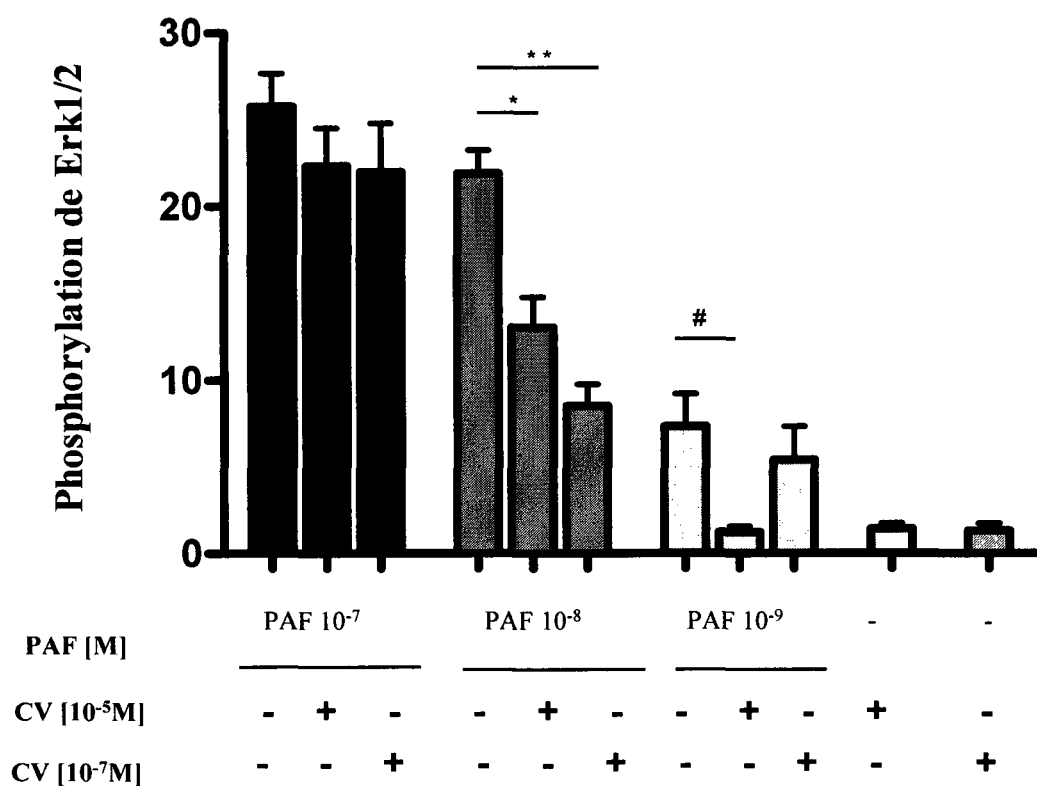
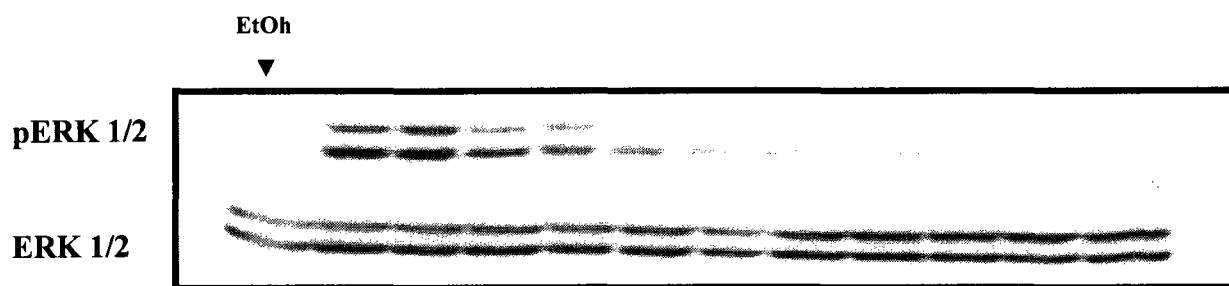


Fig 12: Efficacité de CV 3988 (10⁻⁵ et 10⁻⁷ M) à inhiber la phosphorylation de Erk 1/2 induite par le PAF (10⁻⁷, 10⁻⁸ et 10⁻⁹ M) dans les cellules HEK 293 PAFR-HA. Les cellules ont d'abord été traitées pendant 30 minutes avec le CV 3988, puis stimulées par le PAF pendant 5 minutes. Les membranes ont été mis en présence de l'anticorps anti pErk 1/2, puis lavées, débarrassées de l'anticorps, puis remises en présence de l'anticorps anti-Erk 1/2. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Les graphiques ont été réalisés suite à l'analyse par densité optique. *, P= 0.0318, **, P = 0.0019 (par rapport au PAF 10⁻⁸ M). #, P = 0.0005 (par rapport à 10⁻⁹ M). Pour chaque point, le ratio pErk 1/2 / Erk1/2 est normalisé par rapport à l'éthanol

Phosphorylation de Erk1/2 dans les HEK-293 PAFR-HA en présence de PAF et de trans-BTP dioxolane

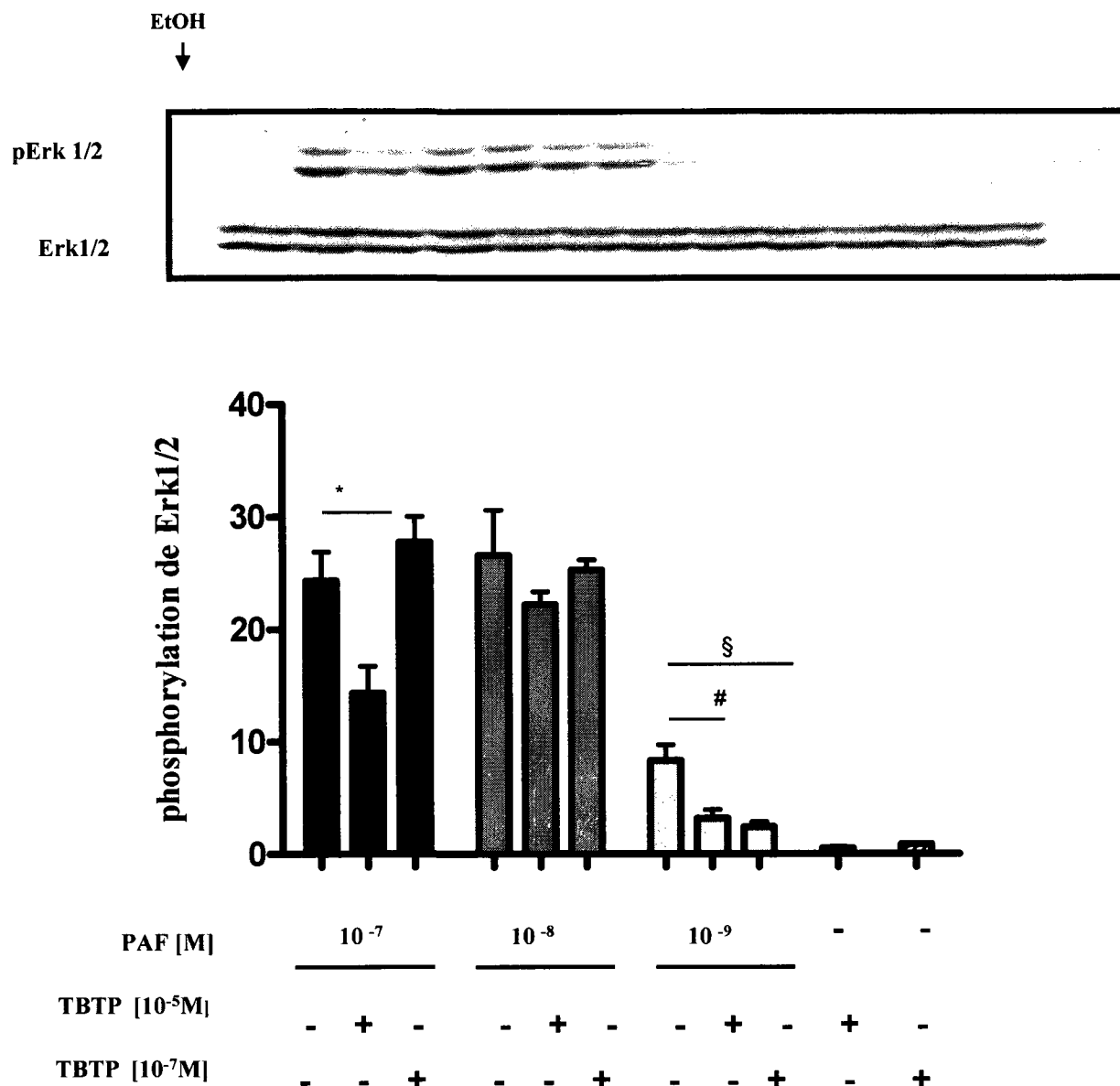


Fig 13: Efficacité du Trans BTP dioxolane (10^{-5} et 10^{-7} M) à inhiber la phosphorylation de Erk 1/2 induite par le PAF (10^{-7} , 10^{-8} et 10^{-9} M) dans les cellules HEK 293 PAFR-HA. Les cellules ont d'abord été traitées pendant 30 minutes avec le TBTP dioxolane, puis stimulées par le PAF pendant 5 minutes. Les membranes ont été mis en présence de l'anticorps anti pErk 1/2, puis lavées, débarrassées de l'anticorps, puis remises en présence de l'anticorps anti-Erk 1/2. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Les graphiques ont été réalisés suite à l'analyse par densité optique. *, $P = 0.0463$ (par rapport à PAF 10^{-7} M), # , $P = 0.0345$, §, $P = 0.0170$ (par rapport à PAF 10^{-9} M). Pour chaque point, le ratio pErk 1/2 / Erk1/2 est normalisé par rapport à l'éthanol.

Phosphorylation de Erk1/2 dans les cellules HEK-293 PAFR-HA en présence de PAF et de BN 52021

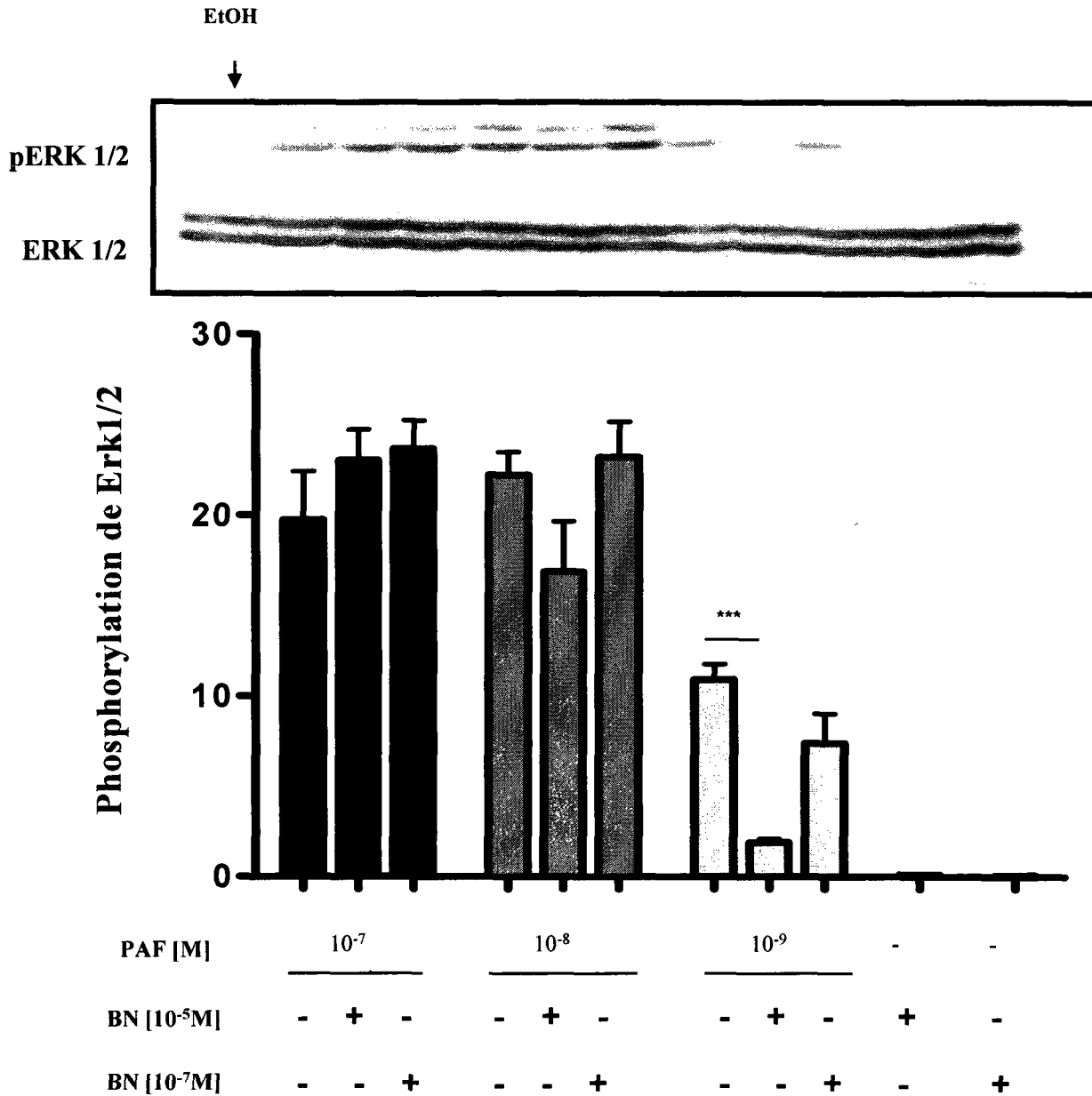


Fig 14: Efficacité du BN 52021 (10⁻⁵ et 10⁻⁷ M) à inhiber la phosphorylation de Erk 1/2 induite par le PAF (10⁻⁷, 10⁻⁸ et 10⁻⁹ M) dans les cellules HEK 293 PAFR-HA. Les cellules ont d'abord été traitées pendant 30 minutes avec le BN 52021, puis stimulées par le PAF pendant 5 minutes. Les membranes ont été mis en présence de l'anticorps anti pErk 1/2, puis lavées, débarrassées de l'anticorps, puis remises en présence de l'anticorps anti-Erk 1/2. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Les graphiques ont été réalisés suite à l'analyse par densité optique. ***, P= 0.0005 (par rapport à PAF 10⁻⁹ M). Pour chaque point, le ratio pErk 1/2 / Erk1/2 est normalisé par rapport à l'éthanol.

Phosphorylation de Erk1/2 dans les cellules HEK-293 PAFR-HA en présence de PAF et de PCA 4248

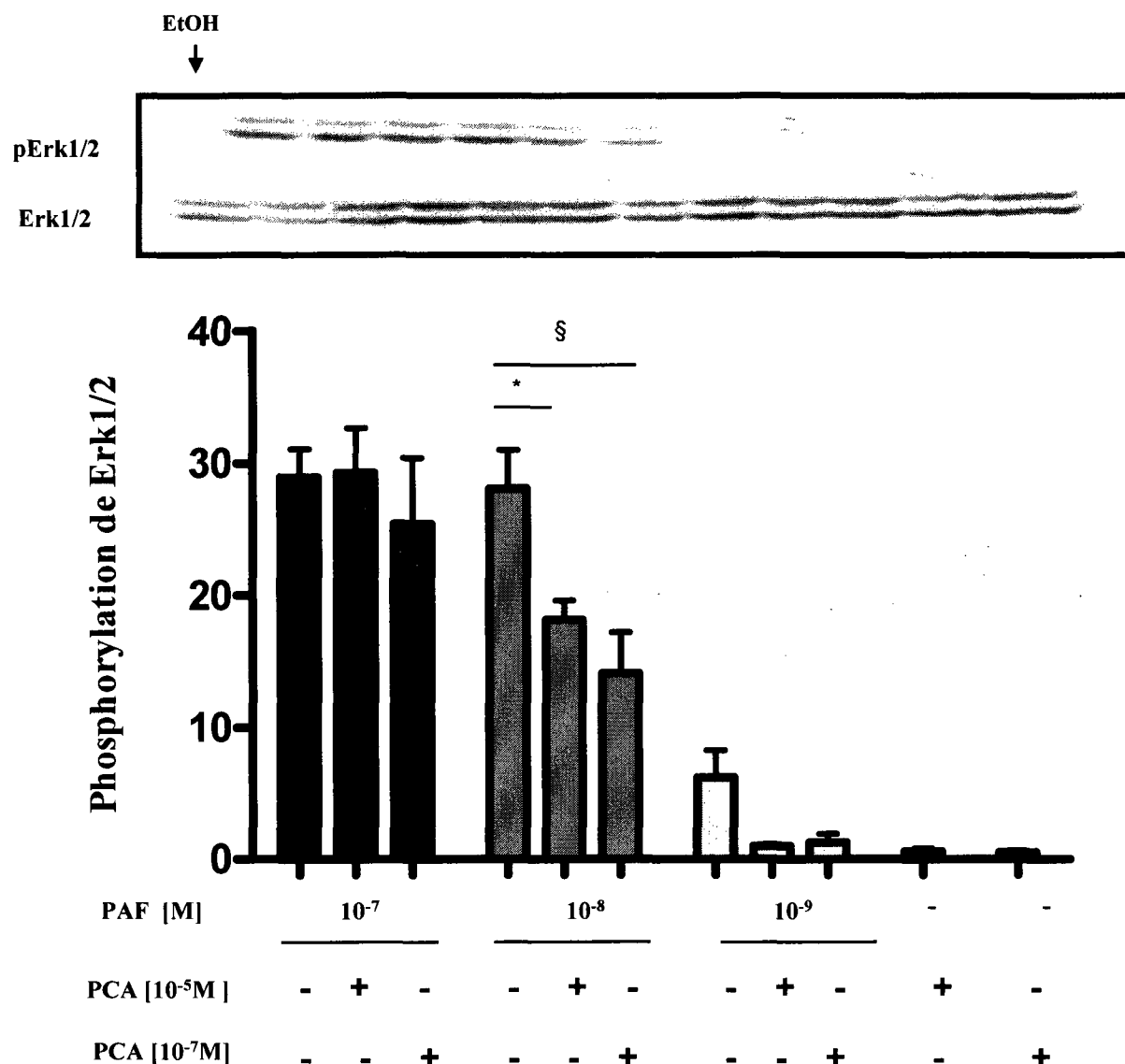


Fig 15: Efficacité du PCA 4248 (10⁻⁵ et 10⁻⁷ M) à inhiber la phosphorylation de Erk 1/2 induite par le PAF (10⁻⁷, 10⁻⁸ et 10⁻⁹ M) dans les cellules HEK 293 PAFR-HA. Les cellules ont d'abord été traitées pendant 30 minutes avec le PCA 4248, puis stimulées par le PAF pendant 5 minutes. Les membranes ont été mis en présence de l'anticorps anti pErk 1/2, puis lavées, débarrassées de l'anticorps, puis remises en présence de l'anticorps anti-Erk 1/2. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Les graphiques ont été réalisés suite à l'analyse par densité optique. *, P = 0.0402 §, P = 0.0315 (par rapport à PAF 10⁻⁸M). Pour chaque point, le ratio pErk 1/2 / Erk1/2 est normalisé par rapport à l'éthanol.

Phosphorylation de Erk1/2 dans les HEK-293 PAFR-HA en présence de PAF et de Web 2086

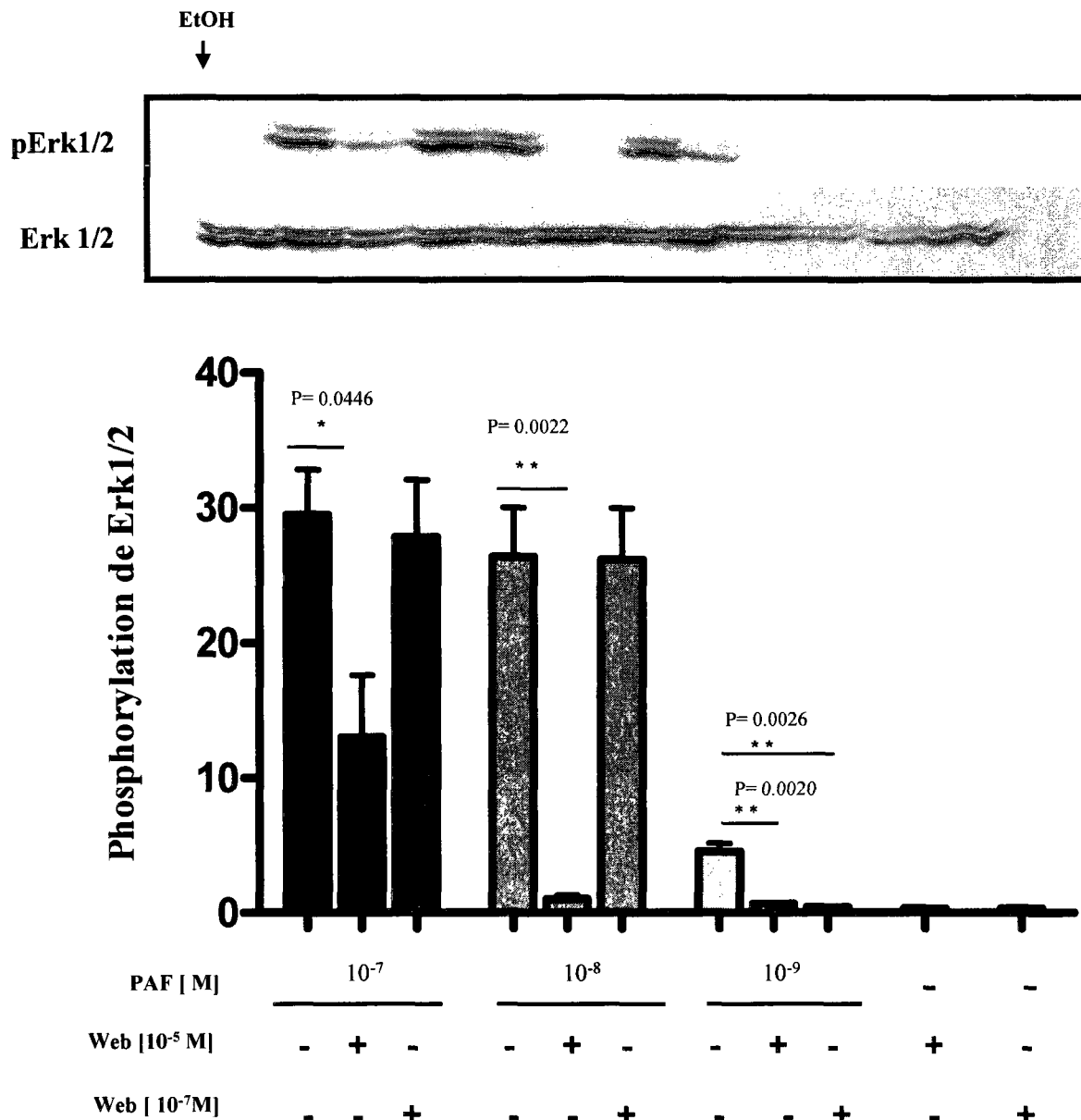


Fig 16: Efficacité du Web 2086 (10⁻⁵ et 10⁻⁷ M) à inhiber la phosphorylation de Erk 1/2 induite par le PAF (10⁻⁷, 10⁻⁸ et 10⁻⁹ M) dans les cellules HEK 293 PAFR-HA. Les cellules ont d'abord été traitées pendant 30 minutes avec le WEB 2086, puis stimulées par le PAF pendant 5 minutes. Les membranes ont été mises en présence de l'anticorps anti pErk 1/2, puis lavées, débarrassées de l'anticorps, puis mises en présence de l'anticorps anti-Erk 1/2. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Les graphiques ont été réalisés suite à l'analyse par densité optique. Pour chaque point, le ratio pErk 1/2 / Erk1/2 est normalisé par rapport à l'éthanol.

7. Modulateurs potentiellement allostériques

Production d'inositols phosphates dans les cellules HEK 293 PAFR-HA en présence de peptides synthétiques

Différents peptides synthétiques, potentiellement allostériques ont été utilisés. D'après les études de Hou et collaborateurs, le peptide THG-315 se comporte comme un antagoniste du PAFR (HOU et al, 2003). Dans nos travaux de recherche, cinq peptides dont le prototype étant le THG-315, ont été utilisés. L'intérêt de travailler avec ces peptides était de déterminer lequel se comportait comme antagoniste, agoniste inverse ou même agoniste en présence du PAFR. Tout d'abord, des essais d'agoniste ont été réalisés, et suite aux résultats obtenus avec la stimulation des cellules HEK 293 PAFR-HA avec les différentes molécules à une concentration de 10^{-7} M, la production d'inositols phosphates obtenue était non significative en comparaison à la stimulation à l'éthanol, alors que le PAF 10^{-7} M (Fig 17A) induisait une augmentation significative de la production d'inositols phosphates, soit sept fois supérieure au niveau obtenu en présence du véhicule. Nous avons donc conclu que ces molécules ne se comportaient pas comme des agonistes du PAFR. Par la suite, des essais d'antagonisme ont été réalisés (Fig 17B). Aucune diminution significative n'a été observée quand les cellules avaient été prétraitées ou non avec les molécules synthétiques puis stimulées avec le PAF 10^{-7} M. Le rétropeptide THG-315 était la seule molécule qui induisait un changement minime voire discret dans la production d'inositols, et donc au lieu de provoquer un effet antagoniste, cette molécule semblait agir de façon synergique avec le PAF pour activer le «turnover» des phospholipides. Finalement des essais d'agonisme inverse ont été réalisés, et d'après les résultats obtenus (Fig. 17C), ces molécules ne se comportaient pas comme des

agonistes inverses, car elles ne diminuaient pas la production basale d'inositols phosphates de façon significative.

Effet des molécules synthétiques sur la production d'inositols phosphates dans les HEK 293 PAFR-HA

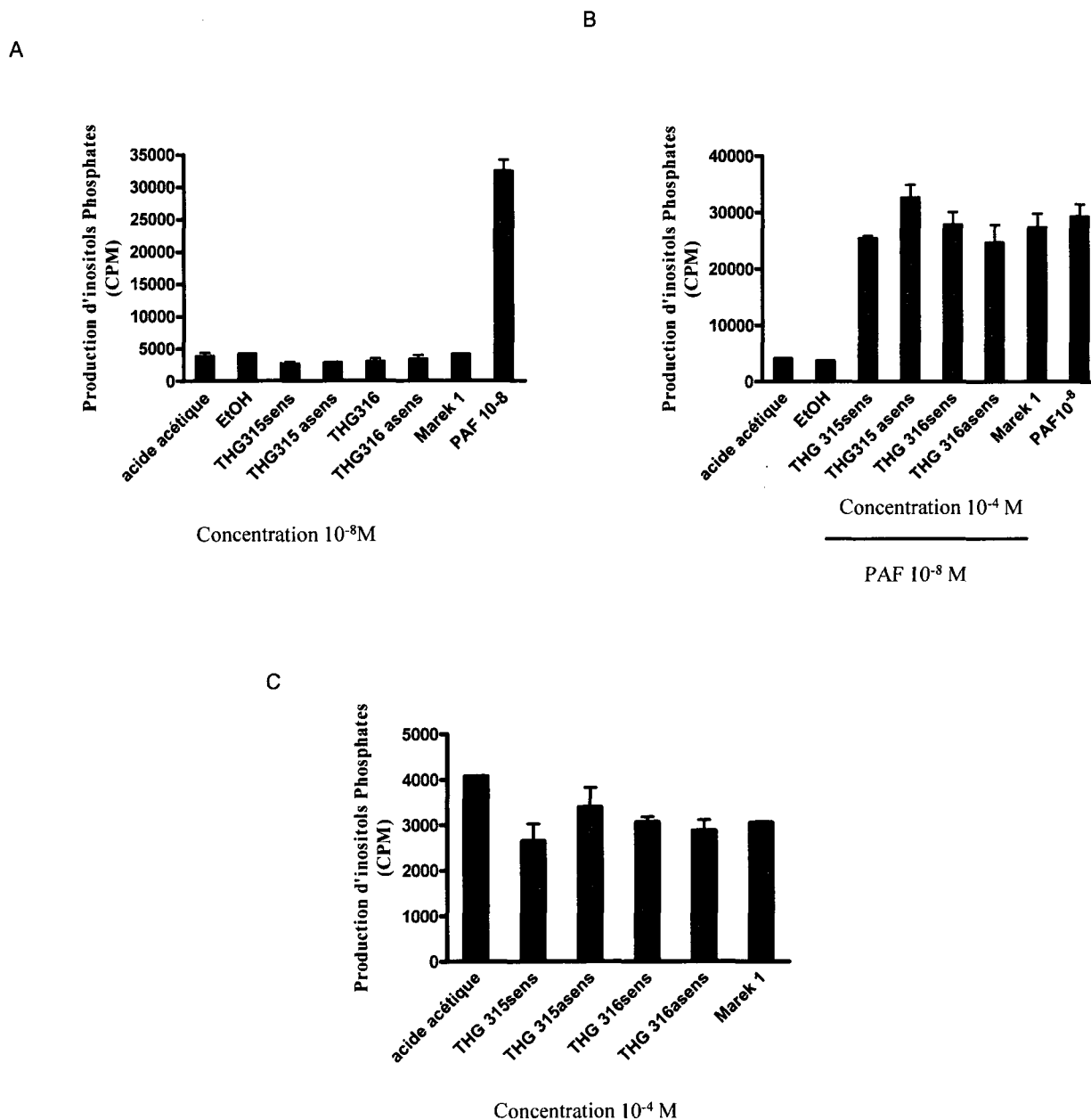


Fig 17: Effet des peptides synthétiques sur la production d'inositols phosphates dans les cellules HEK 293 PAFR-HA. A: La production d'inositols phosphates a été mesurée après la stimulation des cellules pendant 5 minutes soit avec les peptides synthétiques ou avec le PAF à une concentration de 10^{-7} M. B: La production d'inositols phosphates a été mesurée après le prétraitement des cellules avec une concentration constante de 10^{-4} M pour les différentes molécules synthétiques pendant 30 minutes, suivie de la stimulation avec le PAF 10^{-7} M pendant 5 minutes. C: La production d'inositols phosphates est mesurée suite à la stimulation des cellules avec les molécules synthétiques à une concentration de 10^{-4} M. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes.

Essais d'antagonisme, d'agonisme / d'agonisme inverse sur la phosphorylation de ERK 1/2 en fonction de la concentration des modulateurs potentiellement allostériques et du PAF

Afin de déterminer si les modulateurs potentiellement allostériques, le THG 315 sens, le rétropeptide THG 315, le THG 316 et le rétropeptide THG 316 et Marek étaient capables d'induire la phosphorylation de ERK1/2, les cellules HEK 293 PAFR-HA ont été stimulées soit avec les modulateurs à une concentration de 10^{-4} M, soit avec le PAF à une concentration de 10^{-7} M. Une phosphorylation hautement significative était obtenue, seulement quand les cellules étaient stimulées avec le PAF, par contre, aucune modulation de la voie des MAPK n'était obtenue suite à l'utilisation des modulateurs synthétiques (Fig 18).

En ce qui a trait à la propriété antagoniste, les cellules ont d'abord été traitées pendant 30 minutes avec les modulateurs à une concentration de 10^{-4} M, puis stimulées avec le PAF 10^{-7} M pendant 5 minutes. Ces modulateurs n'avaient aucun effet sur la phosphorylation des kinases ERK1/2 induite par le PAF, à part le traitement au rétropeptide THG 315 qui semblait induire une légère augmentation de la phosphorylation de ERK 1/2 en comparaison avec les cellules stimulées seulement avec le PAF (Fig 19). Les modulateurs utilisés ne semblaient pas pouvoir moduler la voie des MAPK dans cette lignée cellulaire.

Effets des peptides synthétiques sur la phosphorylation de Erk 1/2 dans les cellules HEK 293-PAFR- HA

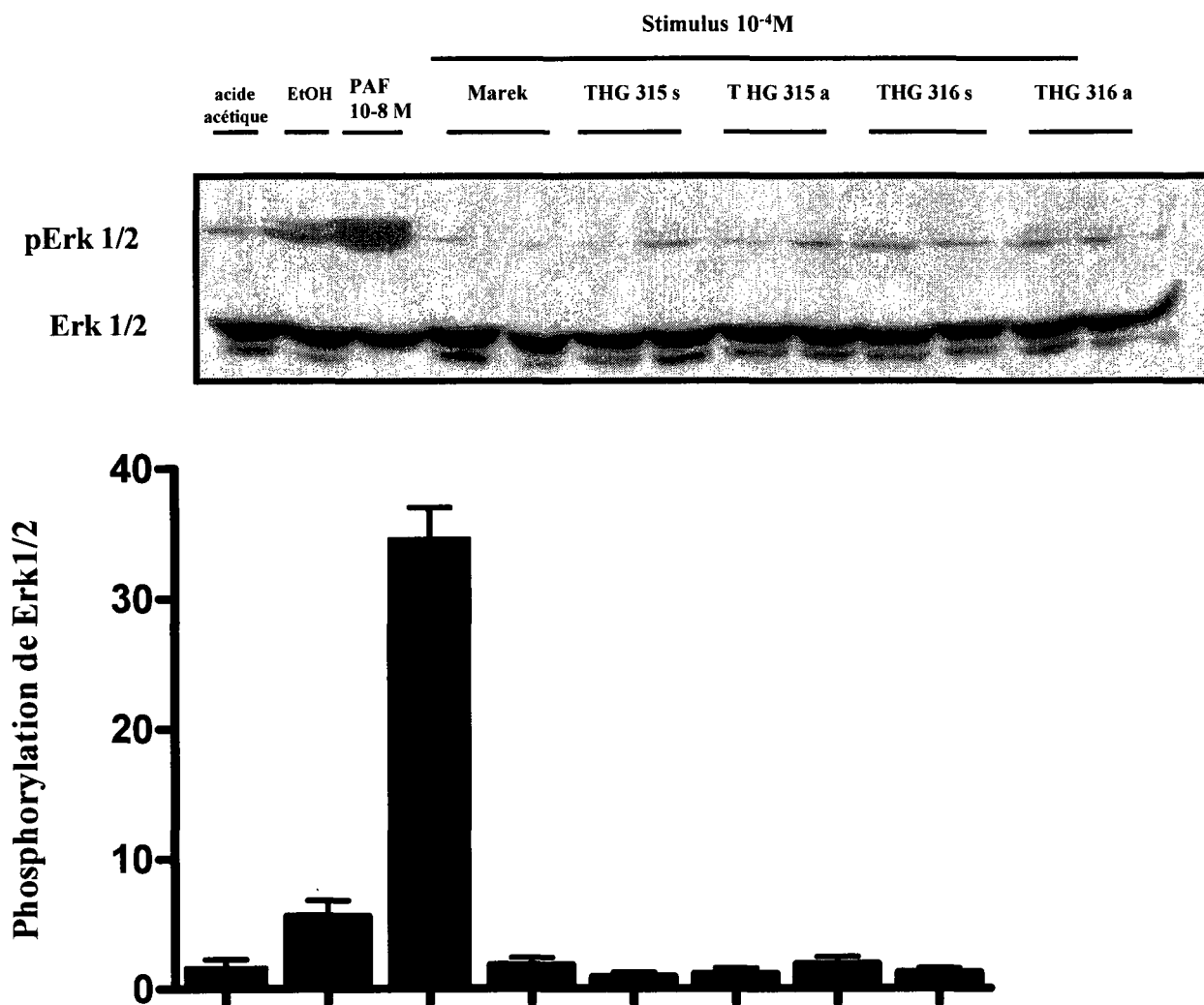


Fig 18: Effet des peptides synthétiques sur la phosphorylation de Erk 1/2 dans les cellules HEK 293 PAFR-HA. Les cellules ont été stimulées pendant 5 minutes soit avec le PAF comme contrôle positif, soit avec l'acide acétique ou l'éthanol comme contrôle négatif ou avec les différentes molécules synthétiques indiquées ci-haut. Les membranes ont été mis en présence de l'anticorps anti pErk 1/2, puis lavées, débarrassées de l'anticorps, et remises en présence de l'anticorps anti-Erk 1/2. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Les graphiques ont été réalisés suite à l'analyse par densité optique. Pour chaque point, le ratio pErk 1/2 / Erk1/2 est normalisé par rapport à l'éthanol.

Effets des molécules synthétiques sur la phosphorylation de Erk 1/2 en présence de PAF dans les HEK 293-PAFR- HA

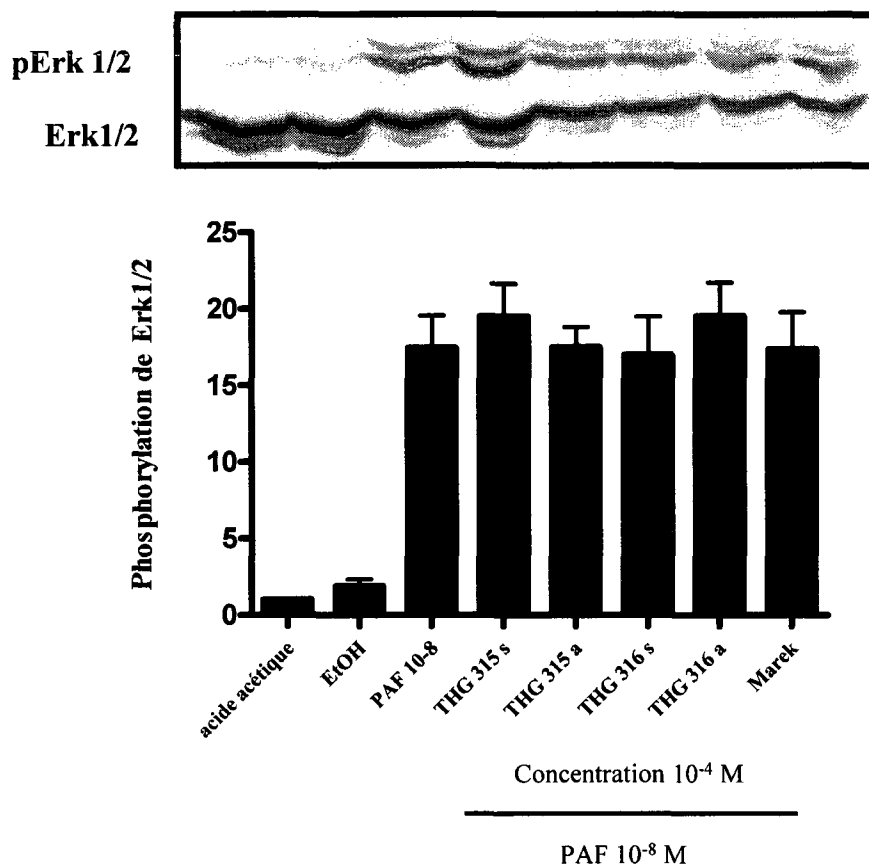


Fig 19: Phosphorylation de Erk 1/2 dans les cellules HEK 293 PAFR-HA en présence des molécules synthétiques et du PAF. Les cellules ont d'abord été traitées ou non pendant 30 minutes avec les molécules indiquées, puis stimulées avec le PAF pendant 5 minutes. Les membranes ont été mis en présence de l'anticorps anti pErk 1/2, puis lavées, débarrassées de l'anticorps, et remises en présence de l'anticorps anti-Erk 1/2. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Pour chaque point, le ratio pErk 1/2 / Erk1/2 est normalisé par rapport à l'éthanol. Les graphiques ont été réalisés suite à l'analyse par densité optique.

Essais de BRET 2 avec les modulateurs potentiellement allostériques

Un nombre important d'études ont montré que plusieurs GPCRs forment des homodimères aussi bien que des hétérodimères (BOUVIER, 2001). Plusieurs récepteurs peuvent former des homodimères : il s'agit entre autres du récepteur β_2 adrénergique, (HÉBERT et al., 1996) et le récepteur δ opioïde, (CVEJIC et DEVI, 1997), les récepteurs de chimiokines CCR_{2b}, CCR₄, et CCR₅ (RODRIGUEZ-FRADE et al., 1999a; RODRIGUEZ-FRADE et al., 1999b) et le senseur de calcium Ca^{2+} (ZHANG et al., 2001). Les agonistes peuvent stabiliser les dimères de plusieurs récepteurs incluant le récepteur β_2 adrénergique et les récepteurs de chimiokines. Ceci suggère que l'homodimérisation pourrait jouer un rôle directement ou non dans le mécanisme d'activation de certains récepteurs ou peut être dans l'internalisation dépendante de l'agoniste comme il a été montré pour le récepteur δ opioïde (CVEJIC et DEVI, 1997). La nécessité de l'hétérodimérisation des GPCRs pour les fonctions physiologiques et pharmacologiques dans les cellules est encore à débattre, par contre certaines études suggèrent que la dimérisation des GPCRs peut jouer un rôle important dans la régulation de leurs activités biologiques. D'autres données suggèrent également que la dimérisation peut être importante pour l'internalisation dépendante de l'agoniste dans le cas du récepteur opioïde δ (CVEJIC and DEVI, 1997). De plus Hébert et ses collaborateurs ont montré que les oligomères constituent la forme active du récepteur β_2 adrénergique (HÉBERT et al., 1996). Ils ont également montré que l'exposition du récepteur à un agoniste inverse promouvait la forme monomérique. De ce fait, les GPCRs montreraient des ressemblances avec les récepteurs de cytokines et de facteurs de croissance, dont l'activation dépend de leur transition de monomères à oligomères (LEMMON et al.,

1997). Afin de voir si les modulateurs potentiellement allostériques inhibaient la dimérisation du PAFR, des essais de BRET 2 ont été réalisés. Les résultats ont montré que la dimérisation du récepteur soit dans les cellules traitées avec les molécules, stimulées avec le PAF ou non, n'avait pas été affectée (Tableau 5).

Tableau 5 : Essai de BRET 2 avec les modulateurs potentiellement allostériques dans les cellules HEK293SL-HA PAFR

	Comptes LUC	Comptes GFP	Ratio GFP / LUC
THG 315 s	106662 +/- 8203.927	26647.67 +/- 3261.347	0.249833
THG 315 a	115665.3 +/- 10487.29	27753 +/- 1807.988	0.239942
THG 316 s	106354 +/- 6812.307	25916.33 +/- 2169.213	0.24368
THG 316 a	137683.3 +/- 12831.22	29410.33 +/- 8445.457	0.213609
Marek 1	101112.3 +/- 8872.773	24571 +/- 3234.672	0.243007
Ethanol	150434.7 +/- 68592.89	32692 +/- 15306.78	0.217317
Acide acétique	67029.33 +/- 9556.837	13961.67 +/- 13850	0.208292
PAF	107737.3 +/- 9771.053	24984.67 +/- 2730.944	0.231904

Tableau 5: Essai de BRET 2 avec les différents modulateurs potentiellement allostériques dans les cellules HEK293SL. Les cellules ont été transfectées avec 0.5 µg de GFP et 0.5 µg de LUC. Elles ont été stimulées ou non avec le PAF et les modulateurs pendant 5 minutes. Elles ont été lavées et après l'ajout du Deep Blue C, les échantillons ont été déposés dans le compteur Fusion TM

7.3 Surnageants d'hybridome

Essais de FACscan avec des surnageants d'hybridome dirigés contre le PAFR

Les surnageants d'hybridomes contiennent des anticorps dirigés contre 9F5, un peptide qui équivaut à la région C terminale de la troisième boucle extracellulaire : GFQDSKFHQA du PAFR. Ce sont donc des anticorps contre le même peptide mais des clones distincts. Le but ultime de travailler avec ces anticorps était de voir quel est le meilleur clone en terme d'affinité et de spécificité pour le PAFR, et de tester par la suite s'ils agissaient comme agonistes ou antagonistes du PAFR. Pour ce faire, des essais de FACscan ont été réalisés. Quatre lignées cellulaires différentes ont été utilisées dont les cellules HEK293 PAFR-HA, et 3 lignées cellulaires différentes ont été utilisées comme témoins négatifs soit les HEK 293, les HEK293 CXCR4-HA, les HEK 293 cysLT1-myc. Les anticorps anti-HA et anti-myc ont été utilisés comme témoins positifs étant donné que les récepteurs PAFR et CXCR4 portaient l'étiquette HA, et que le récepteur CysLT1 portait l'étiquette myc. La figure 20 (A- F) représente le contrôle négatif pour le marquage extracellulaire des différents récepteurs PAFR, CXCR4 et le CysLT1. Aucun anticorps primaire n'a été ajouté et comme attendu le marquage obtenu était négligeable et variait de 0.5% à 10%. La figure 21 (A-C) représente le contrôle positif pour le marquage extracellulaire des récepteurs PAFR, CXCR4 et CysLT1. Vu que les récepteurs PAFR et CXCR4 contiennent l'étiquette HA et le récepteur CysLT1 contient l'étiquette myc, les anticorps primaires anti-HA et anti-myc ont été utilisés dans un premier temps comme contrôle positif. Le marquage obtenu montre clairement que les cellules expriment les récepteurs d'intérêt. Le pourcentage de marquage obtenu pour le PAFR est de 70%, celui obtenu pour le CXCR4 est de 74% et finalement de 49% pour le CysLT1.

Un très faible marquage des différents récepteurs, variant de 3% à 40% est obtenu lorsque les différents surnageants d'hybridomes sont utilisés comme anticorps primaires (Fig22 pour le 9F5 1C1, Fig 23 pour le 9F5 1B4, Fig24 pour le 9F5 1F8, Fig25 pour le 9F5 1H4, Fig26 pour 9F5 2B3 et Fig27 pour le 9F5 2E4). Le marquage obtenu avec les différents surnageants d'hybridomes est cependant non spécifique pour le PAFR puisqu'il n'y a pas une grande différence dans le pourcentage de marquage pour le PAFR et le CXCR4 (Figs 22 à 27). De plus, les résultats montrent que ces surnageants peuvent reconnaître d'autres récepteurs ou d'autres antigènes sur les cellules utilisées puisqu'un marquage est obtenu avec les cellules n'exprimant aucun des récepteurs d'intérêt. Le marquage est extrêmement faible pour le récepteur CysLT1, il variait de 2% à 7% pour tous les surnageants d'hybridome (Figs 22 à 27). En conclusion, les résultats obtenus montrent que ces surnageants d'hybridome n'étaient pas spécifiques au PAFR.

Contrôle négatif pour le marquage extracellulaire de PAFR, CXCR4 et CysLT1

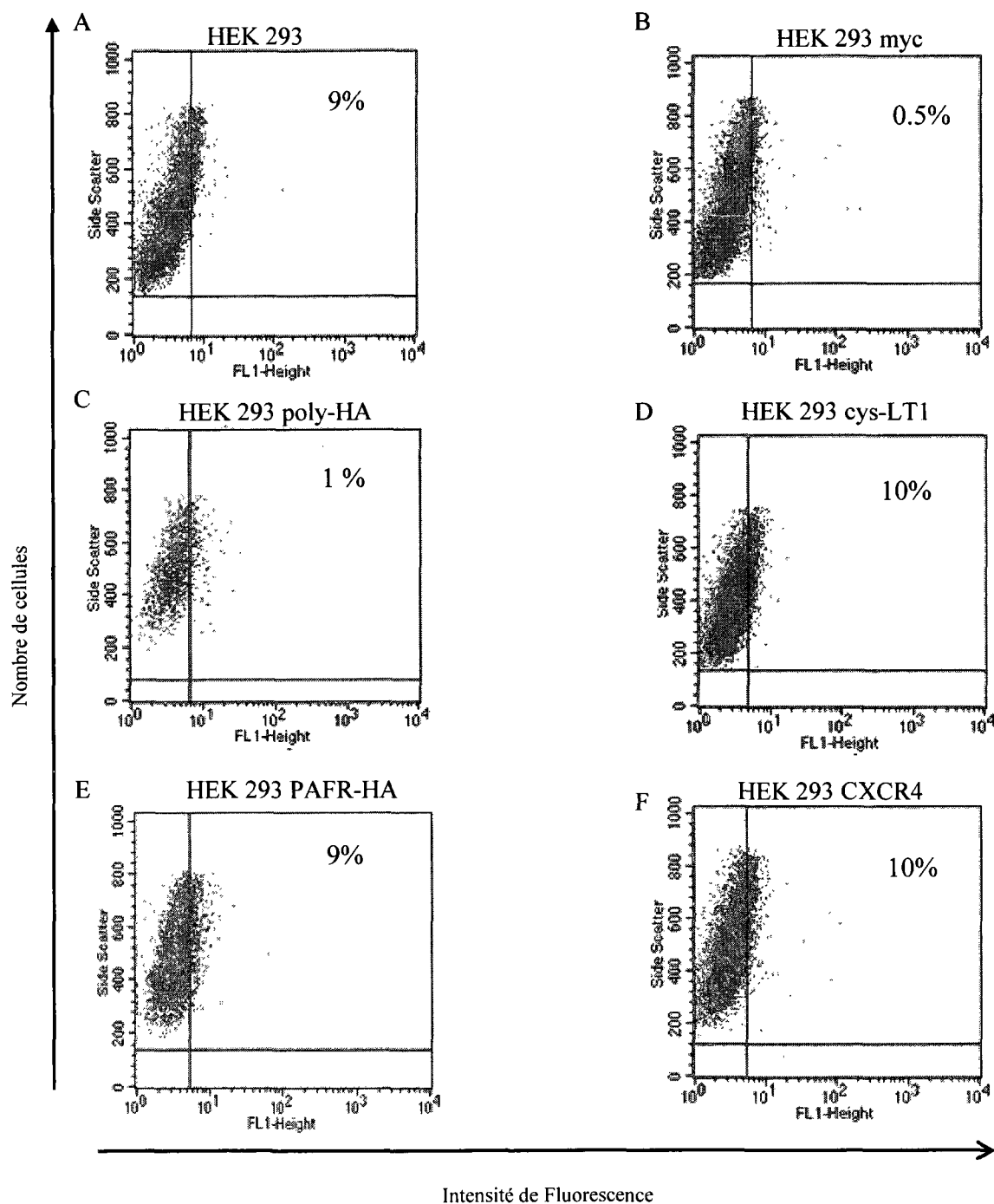


Fig 20: Contrôle négatif de marquage extracellulaire du PAFR pour les différents surnageants d'hybridome . Un marquage de contrôle négatif a été réalisé sur les différents types de cellules A: HEK293, B: HEK293 myc C: HEK 293 poly-HA, D: HEK 293 CysLT1, E: HEK 293 PAFR-HA, F: HEK 293 CXCR4-HA . Aucun anticorps primaire (surnageant d'hybridome) n'a été ajouté. Les cellules ont été mises en présence de PBS 2% BSA pendant 45minutes à 4°C, lavées puis mises en présence de l'anticorps secondaire couplé au FITC (IgG+ IgM) pendant 30 minutes à 4°C. Les échantillons sont lus en cytométrie de flux et analysés avec le programme CellQuest Pro (V.5.2.1).

Contrôle positif pour le marquage extracellulaire de PAFR, CXCR4 et CysLT1

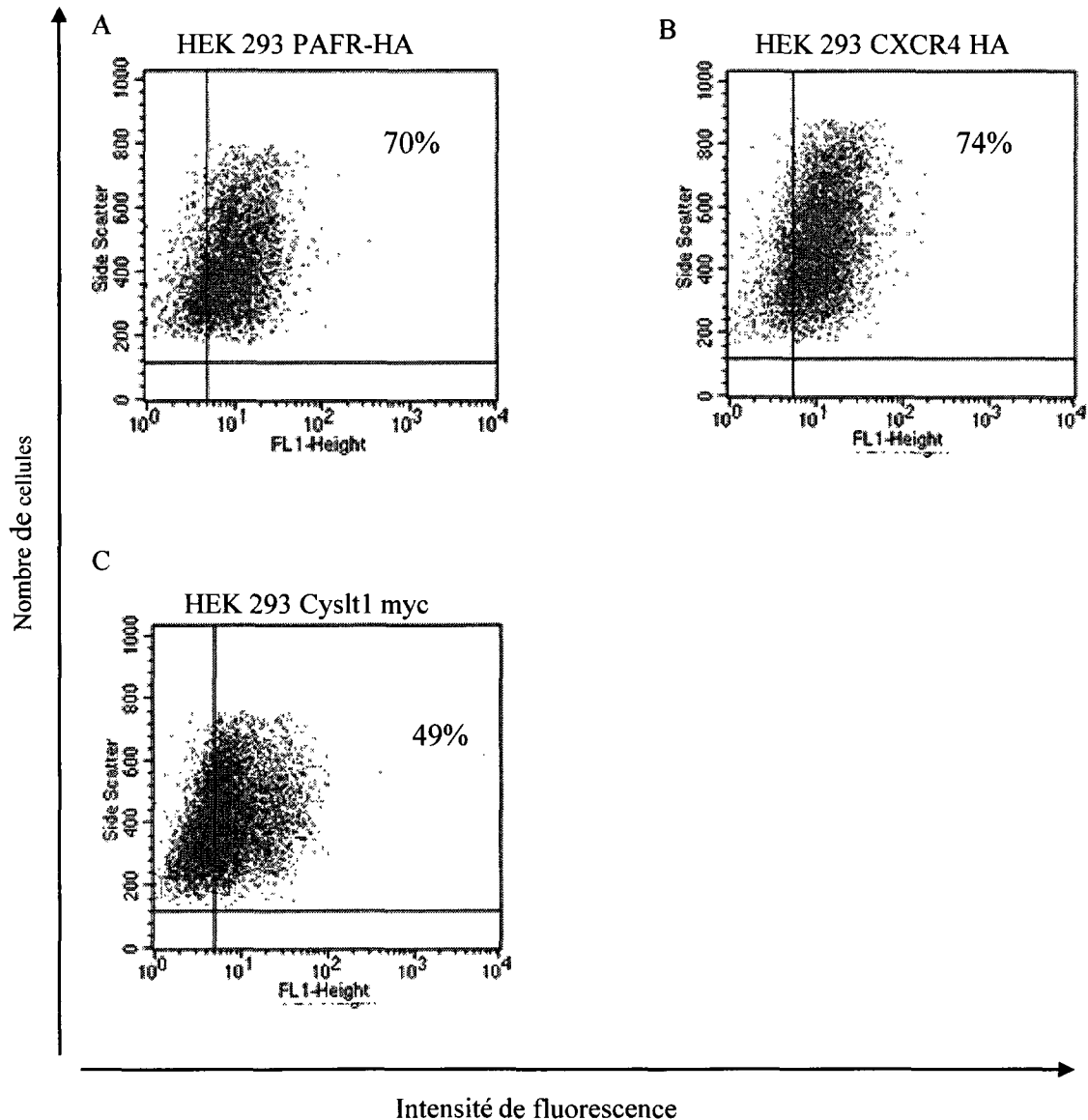


Fig 21: Contrôle positif de marquage extracellulaire du PAFR, CXCR4 et CysLT1 pour les différents surnageants d'hybridome. Un marquage de contrôle positif a été réalisé sur les différents types de cellules. L'anticorps primaire anti-HA pour les récepteurs PAFR et CXCR4 (A et B) et l'anticorps primaire anti-myc (C) pour le récepteur CysLT1 ont été ajoutés aux différents types cellulaires pendant 45 minutes à 4°C, lavées puis mises en présence de l'anticorps secondaire couplé au FITC (IgG+ IgM) pendant 30 minutes à 4°C. Les échantillons sont lus en cytométrie de flux et analysés avec le programme CellQuest Pro (V.5.2.1).

Marquage extracellulaire de PAFR, CXCR4 et CysLT1 avec 9F5 1C1

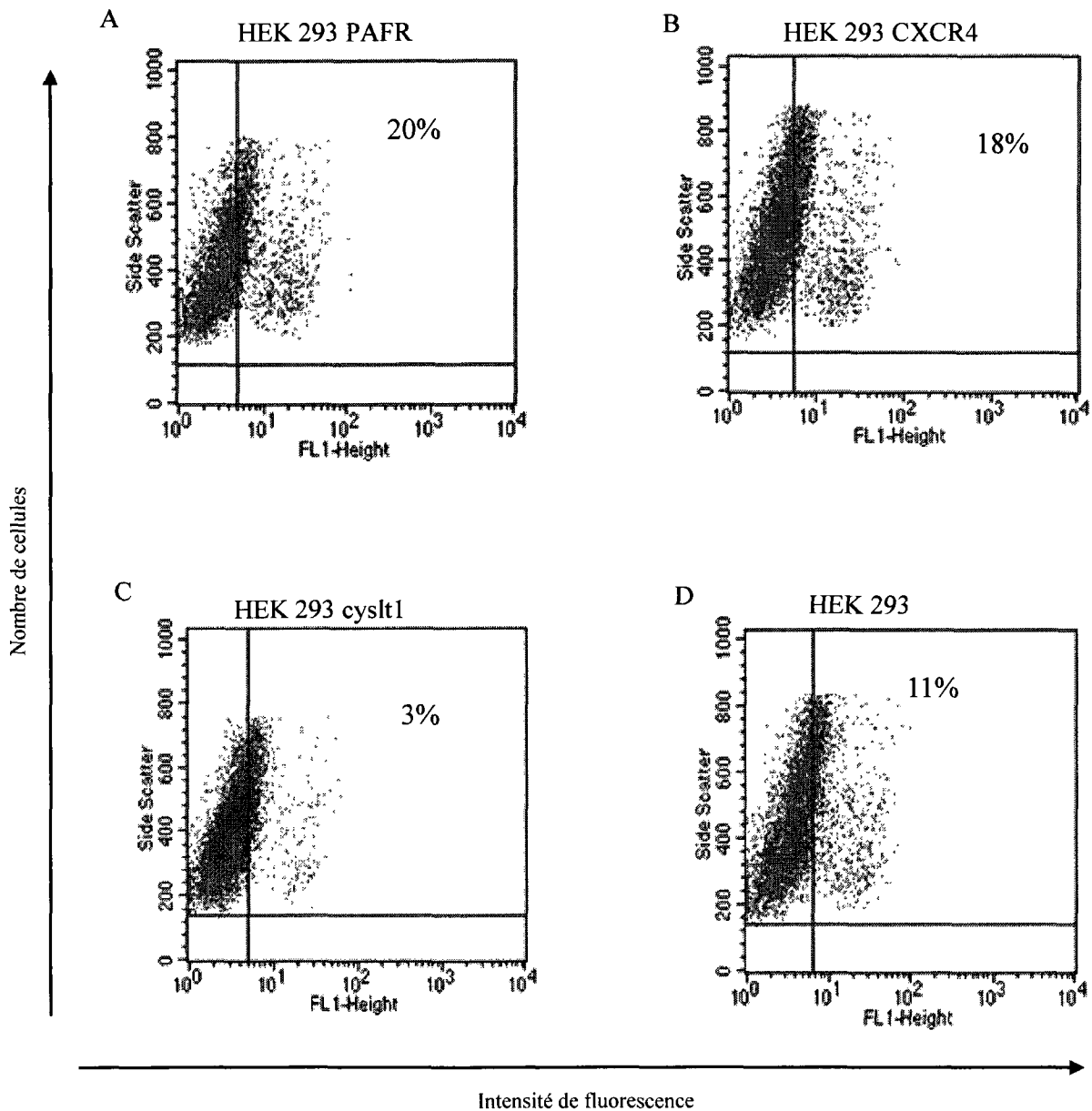


Fig 22: Marquage extracellulaire du PAFR , CXCR4 et CysLT1 ainsi que les cellules HEK 293 avec le surnageant d'hybridome 9F5 1C1. Les cellules A: HEK 293 PAFR-HA, B: HEK 293 CXCR4-HA, C: HEK 293 Cyslt1-myc et D: HEK 293 ont été mises en présence du surnageant d'hybridome 9F5 1C1 non dilué pendant 45minutes à 4°C, lavées puis mises en présence de l'anticorps secondaire couplé au FITC (IgG+ IgM) pendant 30 minutes à 4°C. Les échantillons sont lus en cytométrie de flux et analysés avec le programme CellQuest Pro (V.5.2.1).

Marquage extracellulaire de PAFR, CXCR4 et CysLT1 avec 9F5 1B4

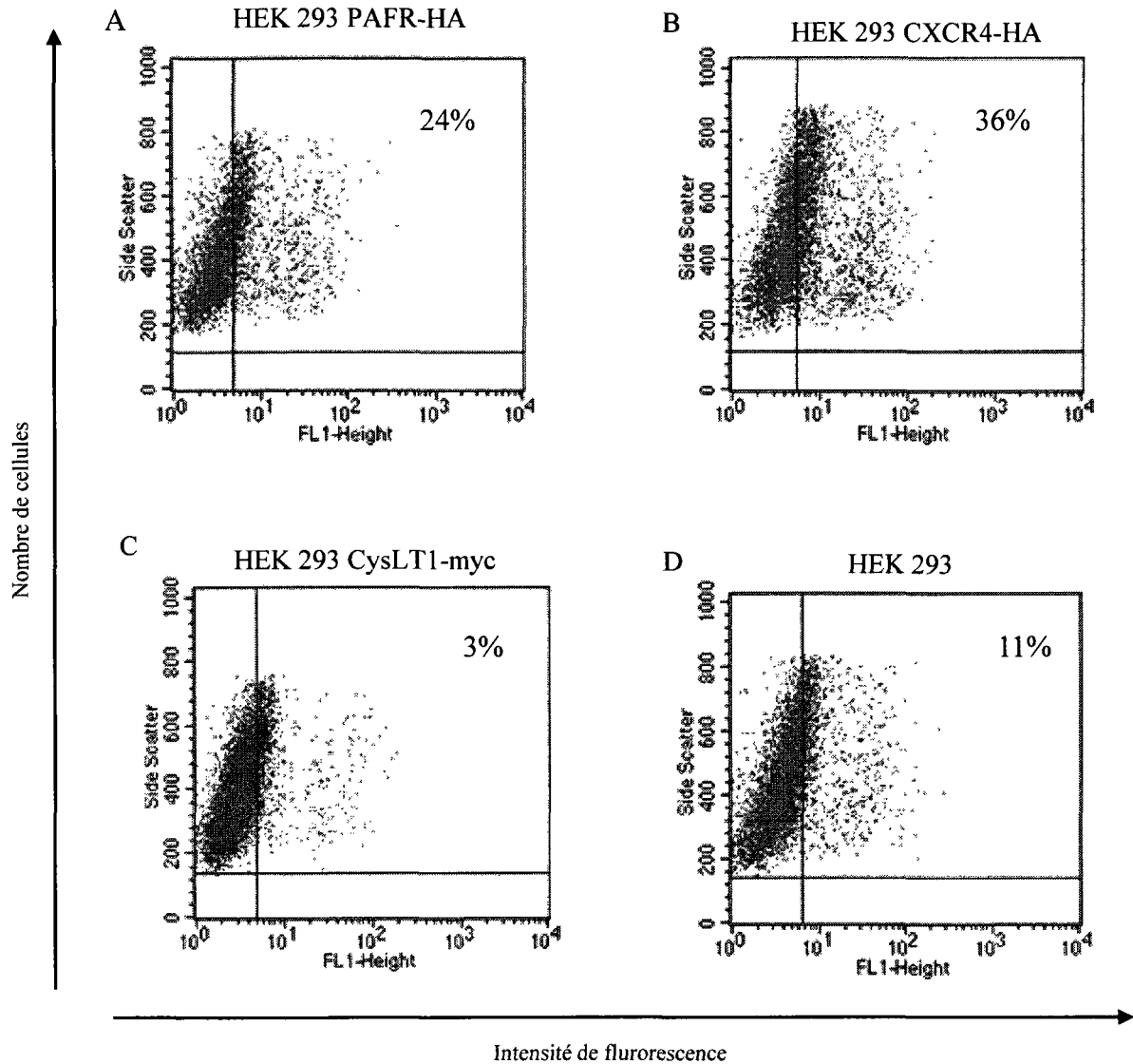


Fig 23: Marquage extracellulaire du PAFR, CXCR4 et CysLT1 ainsi que les cellules HEK 293 avec le surnageant d'hybridome 9F5 1B4. Les cellules A: HEK 293 PAFR-HA, B: HEK 293 CXCR4-HA, C: HEK 293 CysLT1-myc et D: HEK 293 ont été mises en présence du surnageant d'hybridome 9F5 1B4 non dilué pendant 45 minutes à 4° C, lavées puis mises en présence de l'anticorps secondaire couplé au FITC (IgG+ IgM) pendant 30 minutes à 4° C. Les échantillons sont lus en cytométrie de flux et analysés avec le programme CellQuest Pro (V.5.2.1).

Marquage extracellulaire de PAFR, CXCR4 et CysLT1 avec 9F5 1F8

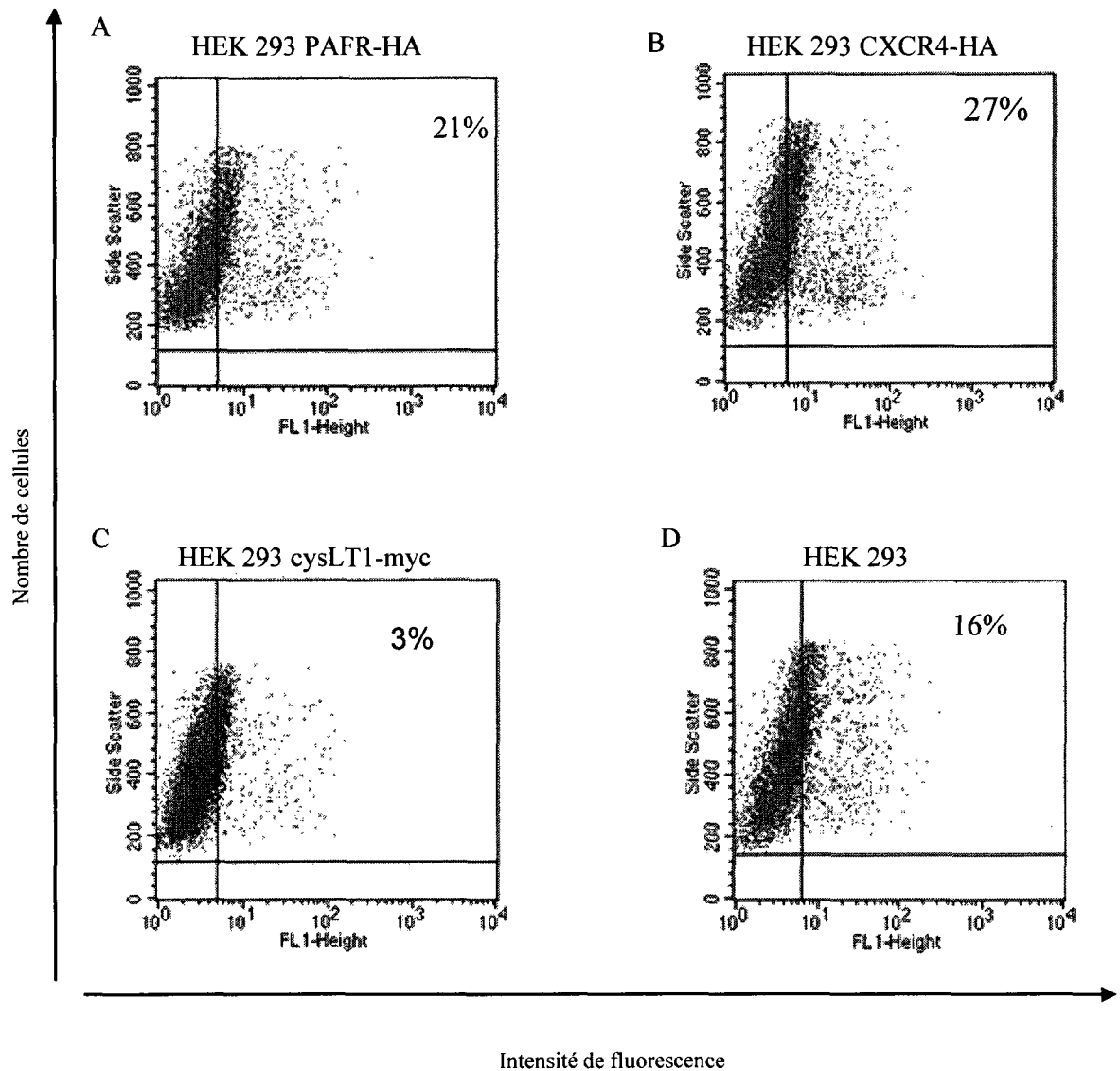


Fig 24. Marquage extracellulaire du PAFR, CXCR4 et CysLT1, ainsi que les cellules HEK 293 avec le surnageant d'hybridome 9F5 1F8: Les cellules A: HEK 293 PAFR-HA, B: HEK 293 CXCR4-HA, C: HEK 293 Cyslt1-myc et D: HEK 293 ont été mises en présence du surnageant d'hybridome 9F5 1F8 non dilué pendant 45 minutes à 4° C, lavées puis mises en présence de l'anticorps secondaire couplé au FITC (IgG+ IgM) pendant 30 minutes à 4° C. Les échantillons sont lus en cytométrie de flux et analysés avec le programme CellQuest Pro (V.5.2.1).

Marquage extracellulaire de PAFR, CXCR4 et CysLT1 avec 9F5 1H4

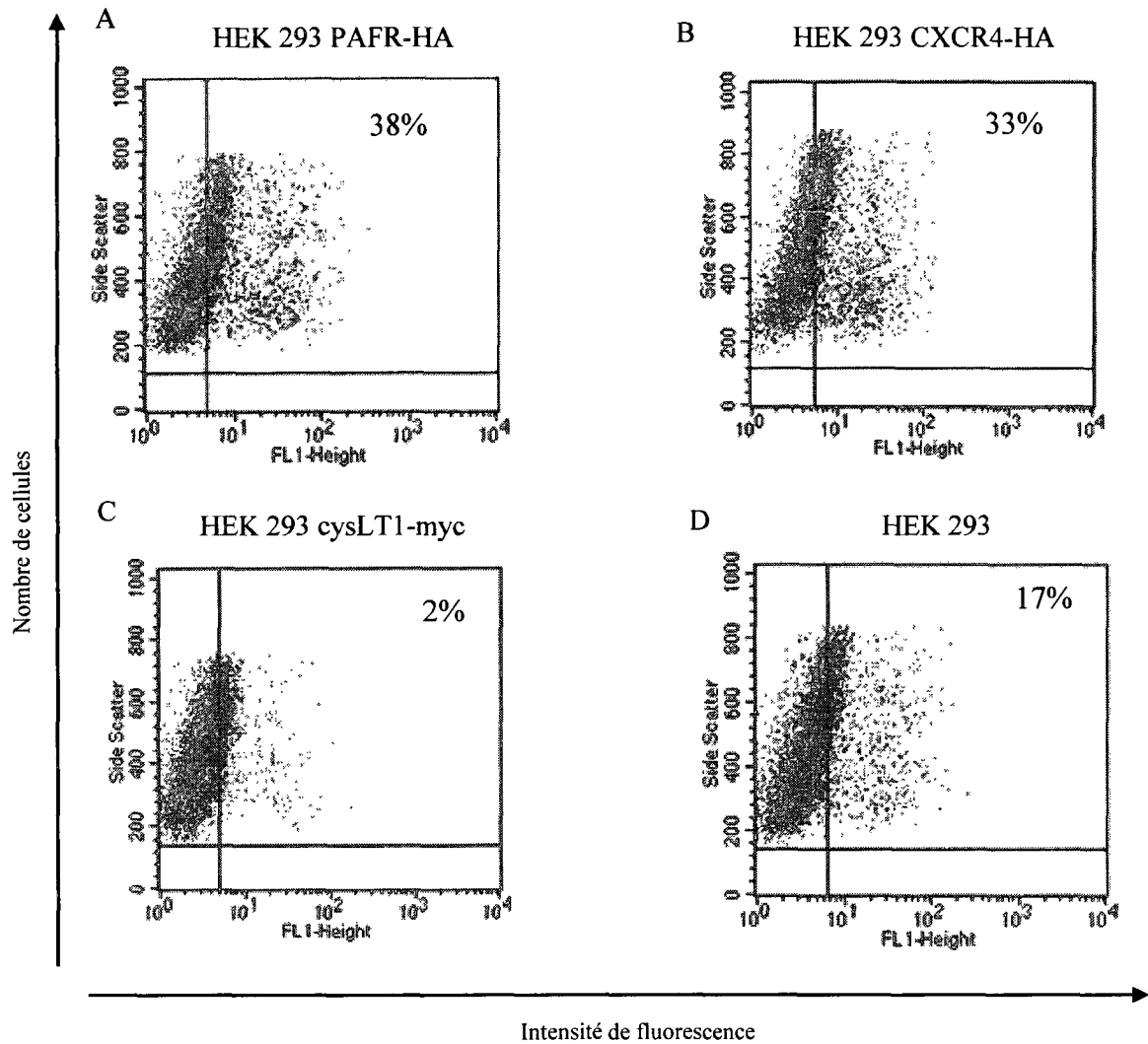


Fig 25. Marquage extracellulaire du PAFR, CXCR4 et CysLT1 ainsi que les cellules HEK 293 avec le surnageant d'hybridome 9F5 1H4. Les cellules A: HEK 293 PAFR-HA, B: HEK 293 CXCR4-HA, C: HEK 293 Cyslt1-myc et D: HEK 293 ont été mis en présence du surnageant d'hybridome 9F5 1H4 non dilué pendant 45 minutes à 4°, lavées puis mises en présence de l'anticorps secondaire couplé au FITC (IgG+ IgM) pendant 30 minutes à 4°. Les échantillons sont lus en cytométrie de flux et analysés avec le programme CellQuest Pro (V.5.2.1).

Marquage extracellulaire de PAFR, CXCR4 et CysLT1 avec 9F5 2B3

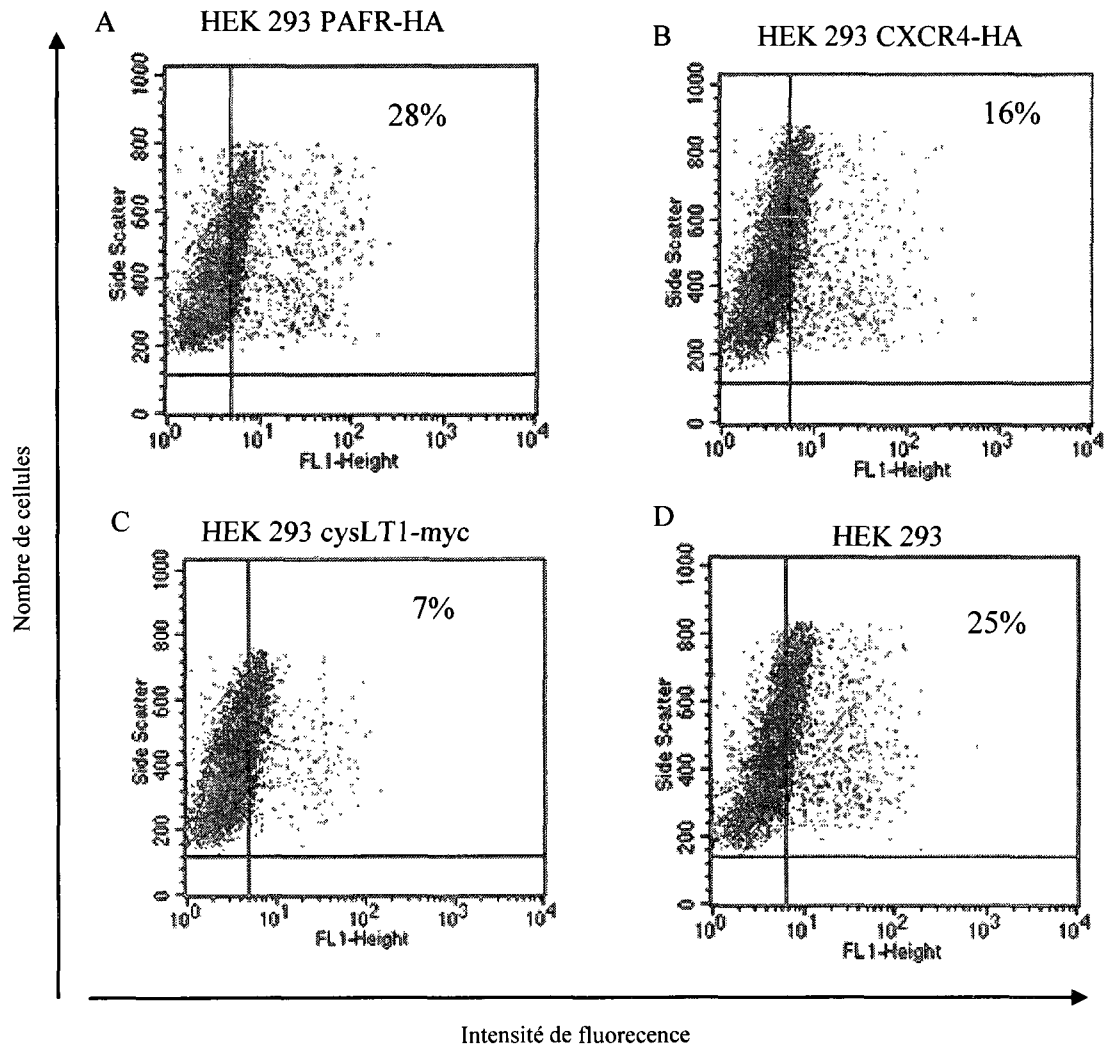


Fig 26. Marquage extracellulaire du PAFR, CXCR4 et CysLT1 ainsi que les cellules HEK 293 avec le surnageant d'hybridome 9F5 2B3: Les cellules A: HEK 293 PAFR-HA, B: HEK 293 CXCR4-HA, C: HEK 293 CysLT1-myc et D: HEK 293 ont été mis en présence du surnageant d'hybridome 9F5 2B3 non dilué pendant 45 minutes à 4°C, lavées puis mises en présence de l'anticorps secondaire couplé au FITC (IgG+ IgM) pendant 30 minutes à 4°C. Les échantillons sont lus en cytométrie de flux et analysés avec le programme CellQuest Pro (V.5.2.1).

Marquage extracellulaire de PAFR, CXCR4 et CysLT1 avec 9F5 2E4

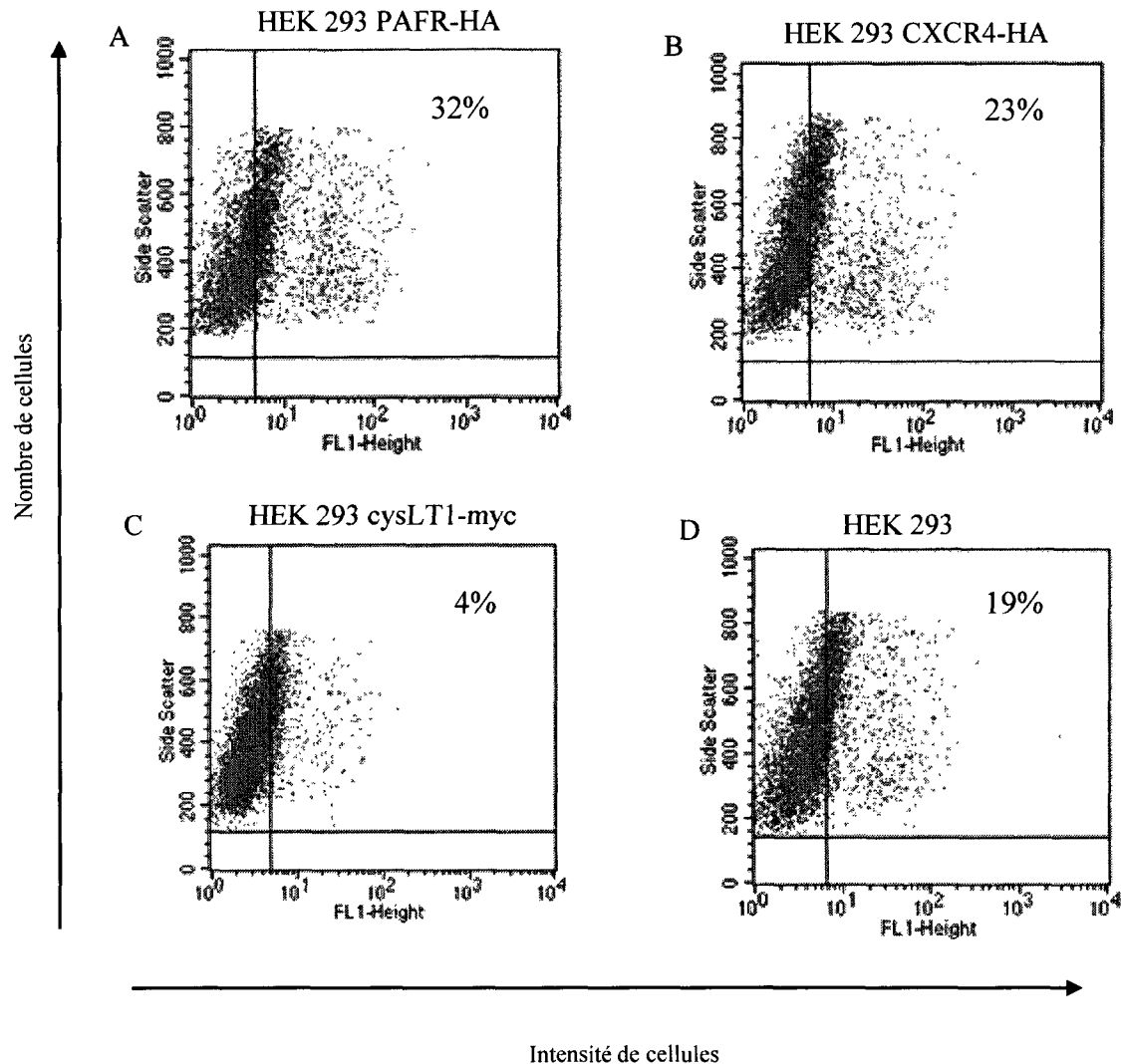


Fig 27. Marquage extracellulaire du PAFR, CXCR4 et CysLT1 ainsi que les cellules HEK 293 avec le surnageant d'hybridome 9F5 2E4: Les cellules A: HEK 293 PAFR-HA, B: HEK 293 CXCR4-HA, C: HEK 293 CysLT1-myc et D: HEK 293 ont été mis en présence du surnageant d'hybridome 9F5 2E4 non dilué pendant 45 minutes à 4°C, lavées puis mises en présence de l'anticorps secondaire couplé au FITC (IgG+ IgM) pendant 30 minutes à 4°C. Les échantillons sont lus en cytométrie de flux et analysés avec le programme CellQuest Pro (V.5.2.1).

Partie 8 : Discussion

Les résultats de cette étude montrent que la phosphorylation de ERK1/2 ainsi que la production d'inositols phosphates induites par le PAF atteignent leur maximum après un temps de stimulation très court qui est de cinq minutes. L'exposition des GPCRs à l'agoniste, est habituellement suivie par leur désensibilisation rapide (BUNEMANN et HOSEY, 1999). Après l'endocytose, un récepteur peut être recyclé à la surface cellulaire ou dégradé, ce qui pourrait expliquer l'augmentation du niveau de phosphorylation de ERK1/2 après une heure de stimulation. Certaines études montrent qu'après un traitement prolongé de plusieurs heures avec l'agoniste, il y a une régulation à la baisse du nombre total de récepteurs, un phénomène qui est dû à une désensibilisation à long terme de ces récepteurs ou à leur dégradation (VON ZASTROW, 2001). Dans des études effectuées dans notre laboratoire, on a montré que la dimérisation de PAFR-GyrB induite par la coumermycine, était suffisante pour engendrer la désensibilisation et l'internalisation du complexe PAFR-GyrB par un mécanisme indépendant des arrestines, des clathrines ou de l'activation de la phospholipase C, mais requérant par contre l'activité de la protéine kinase C (PERRON et al., 2003).

De plus, plusieurs études sont unanimes à proposer que la deuxième phase de phosphorylation pourrait être due à l'activation de la famille des tyrosines kinases Src (SNEDDON et FRIEDMAN, 2007; GESTY-PALMER et al., 2006; GUO et al., 2006). Il n'est donc pas étonnant que probablement, suite à une internalisation du PAFR ou à l'activation d'autres protéines kinases qu'on assiste à une modulation à la baisse des voies de signalisation dépendantes de l'état d'activation du PAFR et à une phosphorylation tardive de Erk1/2. À la lumière de ces études, ces résultats supportent

donc la phosphorylation biphasique des kinases ERK1/2 observée en réponse à la stimulation des cellules par le PAF.

Dans nos essais sur la production d'inositols phosphates, les résultats montrent qu'une concentration de PAF de 10^{-8} M à 10^{-6} M était efficace à induire une production significative d'inositols phosphates. Ces données sont en accord avec l'étude menée par Abebe et collaborateurs qui ont montré que l'augmentation de la production d'inositols phosphates induite par le PAF dans les cellules U937 était significative quand elles étaient stimulées avec le PAF à une concentration de 10^{-9} M à 10^{-5} M (ABEBE et al., 1996).

Il a été rapporté dans le contexte de certains GPCRs que certaines molécules pouvaient agir comme des agonistes inverses et réduire les niveaux de l'activité spontanée de ces récepteurs et également réduire les réponses cellulaires fonctionnelles (CHIDIAC et al., 1994). Certains GPCRs peuvent être actifs de façon spontanée, ce qui suggère une conformation entre deux états, donc un équilibre entre la conformation inactive et active en absence de l'agoniste (LEFF, 1995). Cette activité indépendante de l'agoniste a été la plupart du temps observée dans les lignées cellulaires ou les souris transgéniques dans lesquelles les récepteurs sont surexprimés ou mutés (BOND et al., 1995). Les composés se comportant comme des agonistes inverses ont une affinité plus élevée pour la conformation inactive, ce qui résulte en une diminution de la proportion des récepteurs ayant une conformation active, et par conséquent, une réduction de l'activité basale des mécanismes effecteurs (SAMAMA et al., 1994). Précédemment, des études effectuées dans notre laboratoire avaient montré que les molécules orthostériques utilisées dans cette

étude pouvaient se comporter comme des antagonistes, mais également comme agonistes inverses du récepteur du PAF (DUPRÉ et al., 2001).

Les molécules orthostériques utilisées appartiennent à différentes familles incluant les benzodiazepines (WEB 2086), des analogues du PAF (CV3988), des ginkolides (BN52021) et autres familles. Jusqu'à présent, le comportement de ces antagonistes et agonistes inverses du PAF n'avait pas été analysé dans la voie des MAPKs. Il s'est avéré que le WEB2086 de la famille des benzodiazépines était l'antagoniste le plus efficace en ce qui a trait à la production d'inositols phosphates. Parmi les autres antagonistes testés, le bromure d'octylonium, le PCA 4248 et le Trans-BTP dioxolane se sont révélés être également d'excellents antagonistes, car ils réduisaient de façon significative le niveau basal de la production d'inositols phosphates. Tous les antagonistes utilisés étaient également des agonistes inverses, et contrairement à ce qui avait été reporté auparavant (DUPRÉ et al., 2001), le bromure d'octylonium s'est également comporté comme un agoniste inverse, car il réduisait le niveau basal de la production d'inositols phosphates. Les autres antagonistes comme le FR49175, le BN52021 et même le PCA4248 ont montré un caractère plus faible d'antagoniste car ils compétitionnent plus faiblement avec le PAF pour son récepteur. La production d'inositols phosphates induite par le PAF était quasiment égale à celle induite dans les cellules préalablement traitées avec les molécules. Le FR49175, le BN52021 et le PCA4248 se comportent tout de même comme des agonistes inverses, car ils réduisaient le niveau basal de production d'inositols phosphates. Il est probable que ces molécules en interagissant plus faiblement avec le récepteur, sont facilement déplacées par le PAF, ou l'autre probabilité est que ces

molécules ne lient pas le récepteur au même site de liaison que le PAF, ce qui pourrait affecter leur caractère antagoniste, sans pour autant perdre leur capacité agoniste inverse.

En ce qui a trait aux essais de phosphorylation de ERK 1/2, le WEB2086 a été la molécule à posséder une meilleure activité antagoniste. Quand les cellules étaient prétraitées au WEB2086 à une concentration de 10^{-5} M, puis stimulées avec le PAF à une concentration de 10^{-8} M, il y avait une réduction très significative de 90% de la production d'inositols phosphates comparativement à celle obtenue quand les cellules étaient stimulées avec le PAF seul. De façon générale, une réduction importante était obtenue lorsque le PAF était 1000 à 10000 fois moins concentré que la molécule, c'est-à-dire 10^{-8} M, 10^{-9} M pour le PAF et 10^{-5} M pour la molécule.

Différents modulateurs potentiellement allostériques ont été également utilisés pour voir si elles avaient une activité antagoniste, agoniste ou agoniste inverse du PAF. D'après les résultats obtenus, ces molécules ne modulaient aucune des deux voies qui avaient été testées, soit la voie des MAPKs et le cycle biochimique des phosphoinositides. Ces molécules pourraient avoir un effet neutre et n'affecteraient en rien la conformation du récepteur. De plus, probablement que ces molécules ne lient absolument pas le récepteur du PAF, et l'une des perspectives pour ce projet de recherche serait de faire un test de liaison du PAF avec ces modulateurs potentiellement allostériques.

Dans un autre ordre d'idées, il a été montré dans des études réalisées auparavant que le THG 315 était un antagoniste du récepteur du PAF (BOUAYAD et al., 2004; HOU et al., 2003). Dans ces études, il avait été montré qu'en cas de stress oxydatif, qu'il y avait formation et activation de plusieurs facteurs notamment l'activation de la phospholipase

A2, qui est une enzyme clé dans la biosynthèse du PAF. Il a été suggéré que la production de PAF dans le cerveau induisait des dommages ischémiques induits par le stress oxydatif chez les nouveaux-nés (AKISU et al., 1998). PAF est capable d'induire la vasoconstriction cérébrale, coronaire et pulmonaire (ARMSTEAD et al., 1988). Le mécanisme de l'action vasculaire est controversé, mais plusieurs investigations ont rapporté que certains de ses effets ont lieu suite à la formation des produits de la cyclooxygénase provenant du cycle de l'acide arachidonique, en réponse à l'activation du récepteur du PAF (DILLON et al., 1988). Dans les études effectuées par Hou et collaborateurs, le prétraitement des tissus cérébraux avec un antagoniste du récepteur de la thromboxane, L-670596, ainsi qu'un antagoniste du récepteur du PAF, le THG 315, avaient diminué de façon importante la vasoconstriction induite par le PAF tout seul (HOU et al., 2003). Contrairement à ce qui était attendu, cette même molécule, le THG 315 considéré comme un antagoniste du PAF, n'exerçait aucun effet sur les voies de signalisation qui avaient été testées dans cette étude. Les études qui démontraient que le THG 315 était un antagoniste du PAF étaient réalisées de façon ex-vivo et in vivo dans une réponse complexe induite par le PAF. Ces études étaient réalisées dans un système d'expression naturelle, tandis que nos études étaient réalisées in-vitro, dans un environnement contrôlé. Il est possible que l'effet antagoniste du composé THG-315 observé in vivo n'était pas directement lié à l'antagonisme du PAFR. Le mode d'action de ces modulateurs n'est pas encore très clair et reste à être élucidé.

Le but des études in vitro, est de disséquer les mécanismes qui mènent à ce genre de réponses complexes et d'être capable d'identifier spécifiquement les voies qu'on devrait cibler pour une thérapie d'une condition mimée par le modèle in vivo chez l'animal. Les

études *in vitro* sont aussi beaucoup plus faciles à faire dans un contexte où l'on voudrait faire des études de structure-activité (SAR) sur plusieurs dérivés d'un même ligand. Par exemple, si le THG 315 s'était avéré efficace contre l'activation de Gq par le PAFR, on aurait pu déterminer quels résidus dans le peptide sont importants ou non avec ce test et ensuite développer un peptidomimétique beaucoup plus stable et efficace que le peptide lui-même. Malheureusement, le THG n'avait aucun effet sur les voies étudiées dans cette étude, mais aussi, ceci est aussi de l'information indiquant que ce ne sont probablement pas ces voies qui sont induites dans le modèle animal où l'on voit un effet du THG.

La suite du projet, serait de tester d'autres voies de signalisation comme la voie des PKC, la migration cellulaire ou autres. En effet, il a d'ailleurs été rapporté que le WEB2086 qui est un excellent antagoniste du PAFR, pouvait également se comporter comme un agoniste du PAFR en activant des isozymes de PKC différents de ceux induits par le PAF (DUPRÉ et al., 2007). D'autres lignées cellulaires pourraient également être utilisées, afin de voir si ces modulateurs potentiellement allostériques auraient un effet sur d'autres types cellulaires par exemple. Des essais de micro-puce pourraient être également réalisés, car l'essai de micro-puce détermine aussi le résultat d'une réponse complexe menant à l'activation de la transcription de gènes précis dont l'activité des promoteurs pourrait être utilisée comme réponse pour un SAR.

Afin de voir si ces modulateurs inhibaient l'oligomérisation du PAFR, nous avons réalisé des essais de BRET permettant de mesurer l'interaction physique entre deux protéines. En effet, un nombre important d'études ont montré que plusieurs GPCRs forment des homodimères aussi bien que des hétérodimères (BOUVIER, 2001). Il a été montré que

plusieurs récepteurs pouvaient former des homodimères : il s'agit entre autres du récepteur β_2 adrénergique (HÉBERT et al., 1996) du récepteur δ opioïde (CVEJIC et DEVI, 1997) des récepteurs de chimiokine CCR_{2b}, CCR₄, et CCR₅ (RODRIGUEZ-FRADE et al., 1999a; RODRIGUEZ-FRADE et al., 1999b) le senseur de Ca^{2+} (ZHANG et al., 2001). Les agonistes peuvent stabiliser les dimères de plusieurs récepteurs incluant le récepteur β_2 adrénergique et les récepteurs de chimiokines. Ceci suggère que l'homodimérisation pourrait jouer un rôle directement ou non dans le mécanisme d'activation de certains récepteurs, ou peut être dans l'internalisation dépendante de l'agoniste comme il a été montré pour le récepteur δ opioïde (CVEJIC et DEVI, 1997). De plus Hébert et ses collaborateurs ont montré que les oligomères constituent la forme active du récepteur β_2 adrénergique (HÉBERT et al., 1996). Ils ont également montré que l'exposition du récepteur à un agoniste inverse promouvait la forme monomérique. De ce fait, les GPCRs possèderaient des ressemblances avec les récepteurs de cytokines et de facteurs de croissance, dont l'activation dépend de leur transition de monomères à oligomères (LEMMON et al., 1997). Les résultats obtenus nous suggèrent que : le PAFR peut dimériser spontanément, indépendamment de la présence du PAF, et que les modulateurs potentiellement allostériques n'inhibent aucunement l'homodimérisation du PAFR.

Nous avons également testé des surnageants d'hybridomes dirigés contre la portion GFQDSKFHQ de la troisième boucle extracellulaire du PAFR. Nos résultats de marquage extracellulaire du PAFR, du CXCR₄, utilisé comme contrôle négatif, et même sur les cellules HEK 293 non transfectées, nous indiquent qu'il n'y a pas de marquage spécifique pour le PAFR. Une explication plausible émanant de ces résultats serait que

les surnageants d'hybridomes ne reconnaissent pas la conformation native du PAFR, ce qui pourrait être dû à la structure 3D du récepteur qui empêcherait l'accessibilité aux anticorps présents dans les surnageants d'hybridomes.

Partie 9 : Conclusion

Les travaux de recherche présentés ici visaient premièrement à déterminer l'activité antagoniste et agoniste inverse des molécules orthostériques sur la production d'inositols phosphates et la phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules HEK293 transfectées de façon stable avec le récepteur du PAF. Ces résultats montrent que l'efficacité de ces molécules orthostériques à antagoniser les réponses induites par le PAF dépend de leur nature et de leur concentration. La caractérisation des modulateurs potentiellement allostériques, en ce qui a trait à leur activité antagoniste, agoniste ou agoniste inverse avec le PAFR a révélé que ces modulateurs ne modulaient aucune des voies majoritairement connues pour être activées par le PAFR, comme la voie des MAPK et le cycle des phosphoinositides, et finalement qu'il n'y avait pas de marquage spécifique du PAFR avec les surnageants d'hybridome étudiés. Vu que le PAF est un puissant phospholipide pro-inflammatoire impliqué dans la physiologie et la pathophysiologie de plusieurs systèmes, incluant le système nerveux, la reproduction, le système respiratoire, trouver une molécule qui inhiberait une réponse induite par le PAF, et qui serait impliquée dans un dommage cellulaire, comme la vasoconstriction de la vascularisation du cerveau par exemple, serait un outil pharmacologique efficace. Le but ultime de l'utilisation de ces molécules était de produire un bon outil pharmacologique capable d'inhiber ou d'atténuer éventuellement un ou des effets pathophysiologiques du PAF. D'autres voies de signalisation peuvent être investiguées afin de voir si ces modulateurs potentiellement allostériques ne seraient pas impliqués dans l'activation d'autres voies de signalisation, dans d'autres systèmes biologiques, avec d'autres lignées cellulaires. En conclusion, les études effectuées dans le cadre de projet indiquent clairement que les

modulateurs utilisés ne possédaient aucune activité dans la lignée cellulaire HEK 293

PAFR-HA

Remerciements

Dre Jana Stankova et Dr Marek Rola- Pleszczynski, directeurs des travaux

Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et m'avoir permis d'apprendre énormément durant deux belles années, de m'avoir transmis une partie de votre connaissance. Merci de m'avoir soutenu tant sur le plan professionnel que moral.

Dr Christian Legouill, pour sa grande contribution à ma compréhension du projet

Dr Gilles Dupuis, pour avoir accepté de corriger ce mémoire et pour toutes les lettres de recommandation

Dr Fernand Gobeil Jr, pour avoir accepté de corriger ce mémoire

Dr Léonid Volkov, pour son aide au microscope confocal

Simon Rollin, pour ses idées et son aide à la rédaction de ce mémoire

Geneviève Hamel-Côté, pour son soutien moral et ses encouragements

Jean-François Larrivée, pour son aide au microscope et ses conseils pour la préparation de mes séminaires

Steeve Véronneau et Sylvie Turcotte, pour les techniques apprises en laboratoire

Bibliographie

ABEBE, W., ALI, N. et AGRAWAL, D. K. (1996). Platelet-activating factor-induced inositol 1,4,5-trisphosphate generation in undifferentiated and differentiated U937 cells: role of tyrosine kinase. *Int J Immunopharmacol* 18, 173-181.

AKISU, M., KULTURSAY, N., COKER, I. et HUSEYINOV, A. (1998). Platelet-activating factor is an important mediator in hypoxic ischemic brain injury in the newborn rat. Flunarizine and Ginkgo biloba extract reduce PAF concentration in the brain. *Biol Neonate* 74, 439-444.

ALI, H., RICHARDSON, R. M., TOMHAVE, E. D., DUBOSE, R. A., HARIBABU, B. et SNYDERMAN, R. (1994). Regulation of stably transfected platelet activating factor receptor in RBL-2H3 cells. Role of multiple G proteins and receptor phosphorylation. *J Biol Chem* 269, 24557-24563.

ALI, M. S., SAYESKI, P. P., DIRKSEN, L. B., HAYZER, D. J., MARRERO, M. B. et BERNSTEIN, K. E. (1997). Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J Biol Chem* 272, 23382-23388.

ARMSTEAD, W. M., POURCYROUS, M., MIRRO, R., LEFFLER, C. W. et BUSIJA, D. W. (1988). Platelet activating factor: a potent constrictor of cerebral arterioles in newborn pigs. *Circ Res* 62, 1-7.

BARBARO, J. F. et ZVAIFLER, N. J. (1966). Antigen induced histamine release from platelets of rabbits producing homologous PCA antibody. *Proc Soc Exp Biol Med* 122, 1245-1247.

BRAULT S, GOBEIL F JR, FORTIER A, HONORÉ JC, JOYAL JS, SAPIEHA PS, KOOLI A, MARTIN E, HARDY P, RIBEIRO-DA-SILVA A, PERI K, LACHAPELLE P, VARMA D, CHEMTOB S.(2007). Lysophosphatidic acid induces endothelial cell death by modulating the redox environment. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 292(3):1174-1183

BENVENISTE, J., HENSON, P. M. et COCHRANE, C. G. (1972). Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J Exp Med* 136, 1356-1377

BENVENISTE, J., TENCE, M., VARENNE, P., BIDAULT, J., BOULLET, C. et POLONSKY, J. (1979). [Semi-synthesis and proposed structure of platelet-activating factor (P.A.F.): PAF-acether an alkyl ether analog of lysophosphatidylcholine]. *C R Seances Acad SciD* 289, 1037-1040

BERRIDGE, MJ., BOOTMAN, MD., RODERICK, HL., (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-529

BLEUL CC, FUHLBRIGGE RC, CASASNOVAS JM, AIUTI A, SPRINGER TA. (1996). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*. 184(3):1101-1109.

BOHR, C., HASSELBALCH, KA, KROGH, A. (1904). Ubereinen in biologischen Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlen-sauerspannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung ubt. *Skandinavian Archives of physiology* 16, 402-412.

BOND, R. A., LEFF, P., JOHNSON, T. D., MILANO, C. A., ROCKMAN, H. A., MCMINN, T. R., APPARSUNDARAM, S., HYEK, M. F., KENAKIN, T. P., ALLEN,

L. F. et LEFKOWITZ. R, J (1995). Physiological effects of inverse agonists in transgenic mice with myocardial overexpression of the beta 2-adrenoceptor. *Nature* 374, 272-276.

BOUAYAD, A., FOURON, J. C., HOU, X., BEAUCHAMP, M., QUINIOU, C., ABRAN, D., PERI, K., CLYMAN, R. I., VARMA, D. R. et CHEMTOB, S. (2004). Developmental regulation of prostaglandin E2 synthase in porcine ductus arteriosus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, R903-909.

BOUVIER, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2, 274-286.

BRAQUET P et ROLA-PLESZCZYNSKI M. The role of PAF in immunological responses: a review. (1987) *Prostaglandins* 34(2):143-148

BUNEMANN, M. et HOSEY, M. M. (1999). G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J Physiol* 517 (Pt 1), 5-23.

CHEN, Z., DUPRÉ, D. J., LE GOUILL, C., ROLA-PLESZCZYNSKI, M. et STANKOVA, J. (2002). Agonist-induced internalization of the platelet-activating factor receptor is dependent on arrestins but independent of G-protein activation. Role of the C terminus and the (D/N)PXXY motif. *J Biol Chem* 277, 7356-7362.

CHEN, Z., ROLA-PLESZCZYNSKI, M. et STANKOVA, J. (2003). Activation of ERK1/2 by platelet-activating factor receptor is independent of receptor internalisation and G-protein activation. *Cell Signal* 15, 843-850.

CHIDIAC, P., HEBERT, T. E., VALIQUETTE, M., DENNIS, M. et BOUVIER, M. (1994). Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol Pharmacol* 45, 490-499.

CVEJIC, S. et DEVI, L. A. (1997). Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem* 272, 26959-26964.

DILLON, P. K., RITTER, A. B. et DURAN, W. N. (1988). Vasoconstrictor effects of platelet-activating factor in the hamster cheek pouch microcirculation: dose-related relations and pathways of action. *Circ Res* 62, 722-731.

DUPRÉ, D. J., LE GOUILL, C., ROLA-PLESZCZYNSKI, M. et STANKOVA, J. (2001). Inverse agonist activity of selected ligands of platelet-activating factor receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 299, 358-365.

DUPRÉ, D. J., THOMPSON, C., CHEN, Z., ROLLIN, S., LARRIVEE, J. F., LE GOUILL, C., ROLA-PLESZCZYNSKI, M. et STANKOVA, J. (2007). Inverse agonist-induced signaling and down-regulation of the platelet-activating factor receptor. *Cell Signal* 19, 2068-2079.

GESTY-PALMER, D., CHEN, M., REITER, E., AHN, S., NELSON, C. D., WANG, S., ECKHARDT, A. E., COWAN, C. L., SPURNEY, R. F., LUTTRELL, L. M. et LEFKOWITZ R, J (2006). Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 281, 10856-10864.

GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C. et NAIRN, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.

GUO, J., WU, H. W., HU, G., HAN, X., DE, W. et SUN, Y. J. (2006). Sustained activation of Src-family tyrosine kinases by ischemia: a potential mechanism mediating

extracellular signal-regulated kinase cascades in hippocampal dentate gyrus. *Neuroscience* 143, 827-836.

HAMDAN, F. F., PERCHERANCIER, Y., BRETON, B. et BOUVIER, M. (2006). Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci* Chapter 5, Unit 5 23.

HARDIE, RC (2007) TRP channels et lipids: from Drosophila to mammalian physiology. *J Physiol* 578: 9-24

HEBERT, T. E., MOFFETT, S., MORELLO, J. P., LOISEL, T. P., BICHET, D. G., BARRET, C. et BOUVIER, M. (1996). A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* 271, 16384-16392.

HONDA, Z., TAKANO, T., GOTOH, Y., NISHIDA, E., ITO, K. et SHIMIZU, T. (1994). Transfected platelet-activating factor receptor activates mitogen-activated protein and (MAP) kinase et MAP kinase kinase in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 269, 2307-2315.

HONDA, Z., ISHII, S. et SHIMIZU, T. (2002). Platelet-activating factor receptor. *J Biochem* 131, 773-779.

HOU, X., GOBEIL, F., JR., MARRACHE, A. M., QUINIOU, C., BRAULT, S., CHECCHIN, D., BERNIER, S. G., SENNLAUB, F., JOYAL, J. S., ABRAN, D, PERI, K, VARMA D, R et CHEMTOB, S (2003). Increased platelet-activating factor-induced periventricular brain microvascular constriction associated with immaturity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, R928-935.

ICHIHARA, S., YAMADA, Y. et YOKOTA, M. (1998). Association of a G994-->T missense mutation in the plasma platelet-activating factor acétylhydrolase gene with genetic susceptibility to nonfamilial dilated cardiomyopathy in Japanese. *Circulation* 98, 1881-1885.

ISHII, S., MATSUDA, Y., NAKAMURA, M., WAGA, I., KUME, K., IZUMI, T. et SHIMIZU, T. (1996). A murine platelet-activating factor receptor gene: cloning, chromosomal localization and up-regulation of expression by lipopolysaccharide in peritoneal resident macrophages. *Biochem J* 314 (Pt 2), 671-678.

ISHII, S. et SHIMIZU, T. (2000). Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res* 39, 41-82.

IZUMI, T. et SHIMIZU, T. (1995). Platelet-activating factor receptor: gene expression and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1259, 317-333.

KAZANIETZ, MG. (2002) Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection. *Mol Pharmacol.* 61:759-767

KUBES, P., IBBOTSON, G., RUSSELL, J., WALLACE, J. L. et GRANGER, D. N. (1990). Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am J Physiol* 259, G300-305.

LACHACHI, H., PLANTAVID, M., SIMON, M. F., CHAP, H., BRAQUET, P. et DOUSTE-BLAZY, L. (1985). Inhibition of transmembrane movement and metabolism of platelet activating factor (PAF-acether) by a specific antagonist, BN 52021. *Biochem Biophys Res Commun* 132, 460-466.

LE GOUILL, C., PARENT, J. L., ROLA-PLESZCZYNSKI, M. et STANKOVA, J. (1997). Structural and functional requirements for agonist-induced internalization of the human platelet-activating factor receptor. *J Biol Chem* 272, 21289-21295.

LEFF, P. (1995). The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* 16, 89-97.

LEMMON, M. A., BU, Z., LADBURY, J. E., ZHOU, M., PINCHASI, D., LAX, I., ENGELMAN, D. M. et SCHLESSINGER, J. (1997). Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J* 16, 281-294.

LUKASHOVA, V., ASSELIN, C., KROLEWSKI, J. J., ROLA-PLESZCZYNSKI, M. et STANKOVA, J. (2001). G-protein-independent activation of Tyk2 by the platelet-activating factor receptor. *J Biol Chem* 276, 24113-24121.

MARINISSEN, M. J. et GUTKIND, J. S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22, 368-376.

MARQUES, S. A., DY, L. C., SOUTHALL, M. D., YI, Q., SMIETANA, E., KAPUR, R., MARQUES, M., TRAVERS, J. B. et SPANDAU, D. F. (2002). The platelet-activating factor receptor activates the extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and induces proliferation of epidermal cells through an epidermal growth factor-receptor-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 1026-1035.

MARRERO, M. B., VENEMA, V. J., JU, H., EATON, D. C. et VENEMA, R. C. (1998). Regulation of angiotensin II-induced JAK2 tyrosine phosphorylation: roles of SHP-1 et SHP-2. *Am J Physiol* 275, C1216-1223.

- MAY, L. T., AVLANI, V. A., SEXTON, P. M. et CHRISTOPOULOS, A. (2004). Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des* 10, 2003-2013.
- MAY, L. T., LEACH, K., SEXTON, P. M. et CHRISTOPOULOS, A. (2007). Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 1-51.
- MELLADO, M., RODRIGUEZ-FRADE, J. M., ARAGAY, A., DEL REAL, G., MARTIN, A. M., VILA-CORO, A. J., SERRANO, A., MAYOR, F., JR. et MARTINEZ, A. C. (1998). The chemokine monocyte chemotactic protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *J Immunol* 161, 805-813.
- MULLER, E., DAGENAIS, P., ALAMI, N. et ROLA-PLESZCZYNSKI, M. (1993). Identification and functional characterization of platelet-activating factor receptors in human leukocyte populations using polyclonal anti-peptide antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5818-5822.
- NAKAMURA, M., HONDA, Z., IZUMI, T., SAKANAKA, C., MUTOH, H., MINAMI, M., BITO, H., SEYAMA, Y., MATSUMOTO, T., NOMA, M. (1991). Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. *J Biol Chem* 266, 20400-20405.
- NICK, J. A., AVDI, N. J., YOUNG, S. K., KNALL, C., GERWINS, P., JOHNSON, G. L. et WORTHEN, G. S. (1997). Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor et FMLP. *J Clin Invest* 99, 975-986.
- PEPLOW, P. V. (1999). Regulation of platelet-activating factor (PAF) activity in human diseases by phospholipase A2 inhibitors, PAF acétylhydrolases, PAF receptor

antagonists and free radical scavengers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 61, 65-82.

PERI KG, QUINIOU C, HOU X, ABRAN D, VARMA DR, LUBELL WD, CHEMTOB S.(2002). THG113: a novel selective FP antagonist that delays preterm labor. *Semin Perinatol* 26(6): 389-397.

PERRON, A., CHEN, Z. G., GINGRAS, D., DUPRÉ, D. J., STANKOVA, J. et ROLA-PLESZCZYNSKI, M. (2003). Agonist-independent desensitization and internalization of the human platelet-activating factor receptor by coumermycin-gyrase B-induced dimerization. *J Biol Chem* 278, 27956-27965.

PRESCOTT, S. M., ZIMMERMAN, G. A. et MCINTYRE, T. M. (1984). Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) when stimulated with thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 3534-3538.

PRESCOTT, S. M., ZIMMERMAN, G. A., STAFFORINI, D. M. et MCINTYRE, T. M. (2000). Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* 69, 419-445.

RICHARDSON, R. M., HARIBABU, B., ALI, H. et SNYDERMAN, R. (1996). Cross-desensitization among receptors for platelet activating factor and peptide chemoattractants. Evidence for independent regulatory pathways. *J Biol Chem* 271, 28717-28724.

RODRIGUEZ-FRADE, J. M., VILA-CORO, A. J., DE ANA, A. M., ALBAR, J. P., MARTINEZ, A. C. et MELLADO, M. (1999a). The chemokine monocyte

chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3628-3633.

RODRIGUEZ-FRADE, J. M., VILA-CORO, A. J., MARTIN, A., NIETO, M., SANCHEZ-MADRID, F., PROUDFOOT, A. E., WELLS, T. N., MARTINEZ, A. C. et MELLADO, M. (1999b). Similarities and differences in RANTES- et (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis. *J Cell Biol* 144, 755-765.

SACHPATZIDIS, A., BENTON, B. K., MANFREDI, J. P., WANG, H., HAMILTON, A., DOHLMAN, H. G. et LOLIS, E. (2003). Identification of allosteric peptide agonists of CXCR4. *J Biol Chem* 278, 896-907.

SAMAMA, P., PEI, G., COSTA, T., COTECCHIA, S. et LEFKOWITZ, R. J. (1994). Negative antagonists promote an inactive conformation of the beta 2-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* 45, 390-394.

SEIFERT, R. et WENZEL-SEIFERT, K. (2002). Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366, 381-416.

SEYFRIED, C. E., SCHWEICKART, V. L., GODISKA, R. et GRAY, P. W. (1992). The human platelet-activating factor receptor gene (PTAFR) contains no introns and maps to chromosome 1. *Genomics* 13, 832-834.

SMILEY, P. L., STREMLER, K. E., PRESCOTT, S. M., ZIMMERMAN, G. A. et MCINTYRE, T. M. (1991). Oxidatively fragmented phosphatidylcholines activate human neutrophils through the receptor for platelet-activating factor. *J Biol Chem* 266, 11104-11110.

SNEDDON, W. B. et FRIEDMAN, P. A. (2007). Beta-arrestin-dependent parathyroid hormone-stimulated extracellular signal-regulated kinase activation and parathyroid hormone type 1 receptor internalization. *Endocrinology* 148, 4073-4079.

STAFFORINI DM, PRESCOTT SM, ZIMMERMAN GA, MCINTYRE TM. (1996). Mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases. *Biochim Biophys Acta* 1301(3):161-173

STAFFORINI DM, MCINTYRE TM, ZIMMERMAN GA, PRESCOTT SM. (2003). Platelet-activating factor, a pleiotropic mediator of physiological and pathological processes. *Crit Rev Clin Lab Sci* 40(6): 643-672.

TAKANO, T., HONDA, Z., SAKANAKA, C., IZUMI, T., KAMEYAMA, K., HAGA, K., HAGA, T., KUROKAWA, K. et SHIMIZU, T. (1994). Role of cytoplasmic tail phosphorylation sites of platelet-activating factor receptor in agonist-induced desensitization. *J Biol Chem* 269, 22453-22458.

TANAKA, T., IIMORI, M., TSUKATANI, H. et TOKUMURA, A. (1994). Platelet-aggregating effects of platelet-activating factor-like phospholipids formed by oxidation of phosphatidylcholines containing an sn-2-polyunsaturated fatty acyl group. *Biochim Biophys Acta* 1210, 202-208.

THIVIERGE, M., PARENT, J. L., STANKOVA, J. et ROLA-PLESZCZYNSKI, M. (1996). Modulation of human platelet-activating factor receptor gene expression by protein kinase C activation. *J Immunol* 157, 4681-4687.

VAN BIESEN, T., HAWES, B. E., RAYMOND, J. R., LUTTRELL, L. M., KOCH, W. J. et LEFKOWITZ, R. J. (1996). G(o)-protein alpha-subunits activate

mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem* 271, 1266-1269.

VON ZASTROW, M. (2001). Endocytosis and downregulation of G protein-coupled receptors. *Parkinsonism Relat Disord* 7, 265-271.

YANG, C., KAZANIETZ, MG., (2007) Chimaerins: GAPs that bridge diacylglycerol signalling and the small G-protein Rac 403: 1-12

ZHANG, Z., SUN, S., QUINN, S. J., BROWN, E. M. et BAI, M. (2001). The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. *J Biol Chem* 276, 5316-5322.

ANNEXES

SOLUTIONS:

Ammonium formate 1,5 M :	94,56 g d'ammonium formate 4,24 mL d'acide formique (88%) Dissoudre dans 1L avec H ₂ O
Ammonium formate 20 mM :	4,24 mL d'acide formique (88%) 13,3 mL d'ammonium formate (1,5 M) Compléter à 1L avec H ₂ O
Acide formique dilué:	2 mL d'acide formique (88%) Compléter jusqu'à 500 mL H ₂ O
Tampon dénaturant 4x pour la migration des protéines	Tris HCl pH 6,8 (0,4 M) SDS (10%) β mercapto-éthanol (20%) Bleu de bromophénol (0.5%) Glycérol (50%)
Bromure d'éthidium	10 mg de bromure d'éthidium 1 mL H ₂ O
Gel de résolution Bis acrylamide :	

Produit	% du gel		
	8%	10%	12%
H ₂ O	4,6 mL	4,0 mL	3,3 mL
Solution de bis/ acrylamide 30% (1% / 29%)	2,7 mL	3,3 mL	4,0 mL
Tris HCl pH8,8 (1,5 M)	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
SDS (10%)	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	6 µL	5 µL	4 µL

Gel de tassement Bis acrylamide :

Produit	% du gel
	4%
H ₂ O	4,6 mL
Solution de bis/ acrylamide 30% (1% / 29%)	2,7 mL
Tris HCl pH6,8 (1,5 M)	2,5 mL
SDS (10%)	100 µL
TEMED	5 µL

Produit	% du gel		
	8%	10%	12%
H ₂ O	4,6 mL	4,0 mL	3,3 mL
Solution de bis/ acrylamide 30% (1% / 29%)	2,7 mL	3,3 mL	4,0 mL
Tris HCl pH8,8 (1,5 M)	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
SDS (10%)	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	6 µL	5 µL	4 µL

Gel de tassement Bis acrylamide :

Produit	% du gel
	4%
H ₂ O	4,6 mL
Solution de bis/ acrylamide 30% (1% / 29%)	2,7 mL
Tris HCl pH6,8 (1,5 M)	2,5 mL
SDS (10%)	100 µL
TEMED	5 µL

PBS 25X:

200 g de NaCl

5 g de KCl
67 g de Na_2HPO_4
6 g de KH_2PO_4

Compléter à 1 L avec H_2O
Ajuster pH à 7,4.

Tampon de migration SDS-PAGE 5X : 15,1 g de Tris base
94 g de Glycine
50 mL de SDS (10%)
Compléter à 1L avec H_2O

Tampon de transfert Western: 1,45 g de Tris base
7,2 g de Glycine
200 mL de méthanol (100%)
Compléter à 1L avec H_2O
Ajuster le pH à 7.5

Solution de lyse (Inhibiteurs) Leupeptin (1 μM)
Aprotinin (2 $\mu\text{g/mL}$)
Soybean trypsin inhibitor (100 $\mu\text{g/mL}$)
AEBSF (1 μM)
Calyculin A (1 nM)
 Na_3VO_4 (1 mM)
Okadaic acid (15 nM)

Tampon de lyse pour détection de phosphorylation stock: 2mL de NaCl (5 M)
10 mL de Tris-HCl (1 M; pH 7.5)
3 mL MgCl_2 (1 M)
1 mL d'EDTA (0,5 M)

	1 mL d'EGTA (0,5 M)
Tampon de lyse pour détection de phosphorylation	<p>100 µL de tampon de lyse de détection de la phosphorylation stock</p> <p>100 µL de Na-deoxycholate (5%)</p> <p>100 µL de Triton</p> <p>Compléter à 1 mL avec H₂O</p> <p>Ajuster le pH à 7.5</p>
Tampon Tris-NaCl (TBS) 10X :	<p>58 g de NaCl</p> <p>12,1 g de Tris base</p> <p>Compléter à 1L avec H₂O</p> <p>Ajuster le pH à 7.5</p>